

アブラナ科植物ファストプランツ *Brassica rapa* における 突然変異検出の実験系の構築と紫外線UV-B、UV-Cによる影響の評価

Construction of an experimental system for detecting mutations in the fast plant *Brassica rapa* and evaluation of the effects of ultraviolet light UV-B and UV-C

奥山みのり¹、見上七星¹、近藤暁乃¹、山田貴裕¹、遠藤金吾¹

OKUYAMA Minori¹、MIKAMI Nanase¹、KONDO Akino¹、YAMADA Takahiro¹、ENDO Kingo¹

秋田県立秋田高等学校理数科¹

Akita Senior High School¹

Corresponding Author's e-mail: endo.kingo.z1@alumni.tohoku.ac.jp

(Received: 2 August 2024; Accepted: 8 October 2024; Released: 15 November 2024)

[要約]

本研究では紫外線によるアブラナ科植物への突然変異生成の検出系を構築することを目的とした。アントシアニン合成に関わる遺伝子であるANL遺伝子について、正常遺伝子をANL⁺、変異遺伝子をanl⁻としたとき本研究で用いたファストプランツ(*Brassica rapa*)はANL^{+/+}のヘテロ接合体となっており、この遺伝子DNAに紫外線が作用しANL^{+/+}である紫細胞からanl^{-/-}である白細胞へ変化したことを指標とし突然変異を検出した。植物の病害抵抗性を誘導することによりうどんこ病発生の抑制に用いられているUV-Bに関しては、本研究において線量を変化させてもファストプランツの突然変異頻度はほとんど変化しなかったため、アブラナ科植物のゲノム不安定性を引き起こすことなく、うどんこ病の抑制に使用できることが示された。UV-Cに関しては、3.2 J/cm²までは線量依存的にファストプランツの突然変異頻度を増加させた。また、4.8 J/cm²におけるファストプランツの突然変異頻度は、細胞死の誘導も推定されることから、3.2 J/cm²と比べて有意水準5%で差が認められなかった上に、他の線量と比べ標準誤差が大きくなっていた。これらのことから、品種改良には3.2 J/cm²の線量が最適だと結論付けた。

The objective of this study was to establish a detection system for UV-induced mutagenesis in *Brassica rapa*. The fast plants used in this study were heterozygous for ANL^{+/+}, where the normal gene is ANL⁺ and the mutant gene is anl⁻. The mutation was detected as an indicator that the DNA of the ANL^{+/+} gene changed from ANL^{+/+} (purple cells) to anl^{-/-} (white cells) when UV light was applied to this gene. UV-B has been used to suppress powdery mildew by inducing disease resistance in plants. The mutation frequency of fast plants hardly changed even when the dose was changed, indicating that UV-B can be used to suppress powdery mildew in Brassica plants without inducing genome instability. UV-C increased the mutation frequency of fast plants in a dose-dependent manner up to 3.2 J/cm². The mutation frequency of fast plants at 4.8 J/cm² was not significantly different from that at 3.2 J/cm² at the 5% significance level, probably due to the induction of cell death, and the standard error was larger than that at other doses. Based on these findings, we concluded that the dose of 3.2 J/cm² is optimal for breeding.

[キーワード] 紫外線, アブラナ科, 突然変異

Ultraviolet rays, Brassica napus, Mutation

1. はじめに

日本における紫外線量は年々増加しており、作物への影響が懸念されている(高橋, 2016)。フロンガスの排出などにより、オゾン層が破壊されていたが、近年オゾン層は回復に向かっている。一方で、エアロゾルなどの大気中の微粒子は紫外線を散乱、吸収することが知られている。日本におけるエアロゾル量は1996年以降わずかながら減少しており、これが1990年代以降に見られる紫外線量の増加の原因であると考えられている(環境省, 2008)。紫外線は波長により315~400 nmのものはUV-A、280~315 nmのものはUV-B、200~280 nmのものはUV-Cに分類されている。UV-Aは地表への到達量が最も多いが、生物への影響は少ない。UV-B、UV-CはともにDNA

中にピリミジン2量体や(6-4)光産物と呼ばれるDNA損傷や、活性酸素の生成を通じてDNA酸化損傷を生成し、DNA複製阻害やDNA複製ミスをもたらすことで細胞死や突然変異などをもたらす(大西, 1986)。UV-Cは地表にほとんど到達していないが、UV-Bよりも細胞障害性が高い。

身近な野菜にはブロッコリーやダイコンなどアブラナ科のものが多く、秋田県には大館地大根や平良カブなどアブラナ科の伝統野菜が多い。紫外線による突然変異生成に関してはイネやキク(山口, 2012)の他、アブラナ科植物ではシロイヌナズナを用いた報告が多い(Szatelman, 2015)。そこで、シロイヌナズナ以外のアブラナ科植物を用いて紫外線UV-BとUV-CによるDNAへの影響を定量し、シロイヌナズナ以外のアブ

ラナ科植物でも紫外線による突然変異検出の実験系を構築することを本研究の第一の目的とした。

日本における紫外線量の増加はほぼ UV-B の線量の増加によるものであり、UV-B のアブラナ科植物への影響を評価することは重要である。また、X線、 γ 線、イオンビームなどの放射線も、活性酸素の生成を通じて生じる DNA 酸化損傷や DNA 二本鎖切断などの DNA 損傷を生じ、突然変異を誘導するため、農作物の品種改良に用いられてきた。秋田県でも「あきたこまち R」という放射線を利用した品種改良でつくられた品種がある(秋田県 web サイト)。しかし、X線や γ 線、イオンビームなどの放射線は遮蔽に特殊な設備を必要とする。これに対して UV-C は容易に遮蔽できるため、より簡便で低コストに品種改良を行うことができる可能性がある。よって、UV-C のアブラナ科植物への影響を評価することも重要である。また、来るべき宇宙開発時代に向けて、月や火星での植物栽培技術の確立を目指す上でも、UV-B、UV-C のアブラナ科植物への影響を評価することは重要である。これらを踏まえ、アブラナ科植物において構築した突然変異検出の実験系を用いて、UV-B、UV-C による影響を評価することを本研究の第二の目的とした。

2. 実験方法

(1) 材料

ファストプランツ(*Brassica rapa*, F₁ ノンパープルステム YG12)、UV-B ランプ(パナソニックライティングデバイス株式会社 SPWFD24UB2PB)、UV-C ランプ(コスモ・バイオ株式会社 VL-6.C 254 nm 1x6W Lamp)を使用した。

(2) 突然変異の検出方法

アブラナ科植物のモデルとしてカブの変種であり、アメリカのウィスコンシン大学で開発されたファストプランツ(*Brassica rapa*)を使用した。ファストプランツは成長が速く、播種から約 1 日で発芽、最短 14 日で開花し、約 40 日で一世代を終えるため(FAST PLANTS web サイト)、短期間で実験結果を得ることができる。本研究では F₁ ノンパープルステム YG12 という品種を使用した。アントシアニン合成に関わる遺伝子である ANZ 遺伝子について、正常遺伝子を ANZ⁺、変異遺伝子を anI としたとき、この品種は元々 ANZ^{+/+} のヘテロ接合体となっており、この遺伝子 DNA に紫外線が作用することで、ANZ⁺ 遺伝子が anI 遺伝子に置換する突然変異が生じ、ANZ^{+/+} である紫細胞から anI^{+/+} である白細胞へと変化する(図 1)。茎の細胞でこのように色の変化を観察することで突然変異を検出することとした。



図 1 F₁ ノンパープルステム YG12 における突然変異のモデル

(3) 実験方法

ファストプランツの種子を脱脂綿上に並べて水を 20 mL 与えた。播種から 24 時間後、発芽した種子に実験 1 では UV-B (0.90 mW/cm²) を、30 分 (2.0 J/cm²)、60 分 (4.0 J/cm²)、90 分 (6.0 J/cm²)、実験 2 では UV-C (1.1 mW/cm²) を 30 分 (1.6 J/cm²)、60 分 (3.2 J/cm²)、90 分 (4.8 J/cm²)、それぞれ暗箱内で照射した。照射から 24 時間～48 時間後に、紫外線を照射しなかった個体の色が紫色に変色してきたタイミングで茎の先端付近を切り取り、顕微鏡で観察し、視野の中の紫細胞、白細胞の数を数えた。これを式(1)に代入し、突然変異頻度を求めた。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{白細胞数(個)}}{\text{全細胞数(個)}} \quad \text{式(1)}$$

各実験区での結果について、4 群間で *Kruskal-Wallis* 検定を有意水準 5 %で行い、有意差のあるものが存在することが認められた場合、さらに 2 群間で *Mann-Whitney U* 検定を有意水準 5 %で行った。なお、検定に際して統計ソフト EZR を用いた(Kanda, 2013)。

3. 結果と考察

(1) 実験 1

0、2.0、4.0、6.0 J/cm² の UV-B を照射したところ、ファストプランツの茎の先端付近の光学顕微鏡像は図 2 の A～D のようになった。

また、突然変異頻度は、UV-B の線量が増加しても有意に変化しなかった(図 3、表 1)。

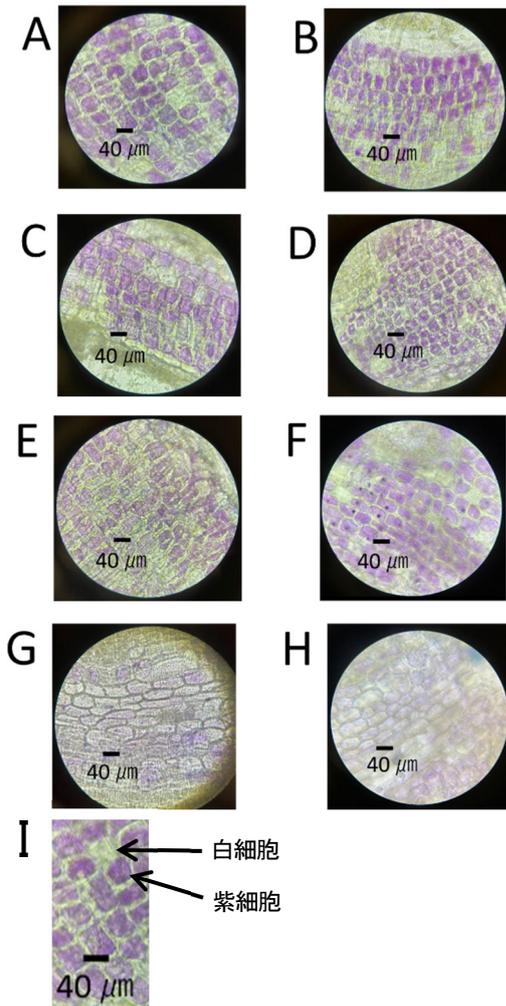


図 2 ファストプランツの茎の先端付近の光学顕微鏡像
 A~DはそれぞれUV-Bを0、2.0、4.0、6.0 J/cm²、E~HはそれぞれUV-Cを0、1.6、3.2、4.8 J/cm²照射したときの顕微鏡写真(倍率150倍)である。IはAの部分的な拡大図であり、白細胞と紫細胞の一例を示している。

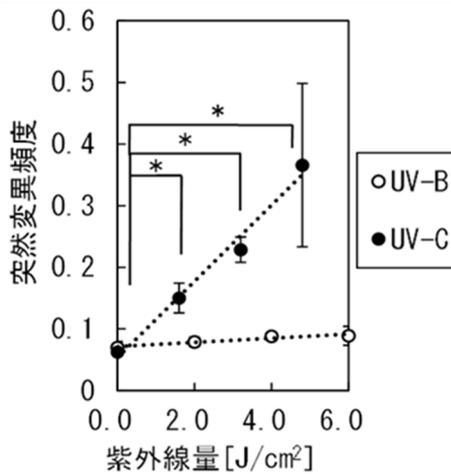


図 3 ファストプランツの突然変異頻度
 エラーバーは標準誤差を表す。

表 1 実験 1 におけるファストプランツの突然変異頻度の平均値と標本数、標準誤差

線量[J/cm ²]	0	2.0	4.0	6.0
突然変異頻度の平均値(×10 ⁻²)	7.0	7.9	8.8	8.9
標本数 <i>n</i>	13	8	5	9
標準誤差 <i>SE</i> (×10 ⁻²)	±0.96	±0.74	±0.55	±1.5

気象庁データによると、日本におけるUV-Bの24時間当たりの照射量は0.2~0.5 J/cm²である。その10倍以上の6.0 J/cm²を90分間でファストプランツに照射しても、紫外線を照射しなかった個体と突然変異頻度は同程度であったため、突然変異は誘発されなかったことがわかり、今後地表に到達するUV-B量が10倍程度に増加してもアブラナ科植物への影響はないことが示唆された。また、UV-Bランプはうどんこ病やハダニの増殖抑制に用いられており(パナソニックライティングデバイス株式会社 web サイト、村田, 2014、刑部, 2019、有元, 2014、神頭, 2011)、アブラナ科の作物に対しては突然変異を誘発することなく、これらの目的にUV-Bは有効に活用できることも示唆された。

(2) 実験 2

0、1.6、3.2、4.8 J/cm²のUV-Cを照射したところ、ファストプランツの茎の先端付近の光学顕微鏡像は図2E~Hのようになった。線量依存的に突然変異頻度は上昇した(図3、表2)。各実験区での結果は *Kruskal-Wallis* 検定を用いて、有意水準5%で4群間の平均値の比較を行ったところ、*p* 値は0.0010となり、突然変異頻度の平均値において、4群間で有意差があることが認められた。さらに、*Mann-Whitney U* 検定を有意水準5%で行ったところ、*p* 値は0と1.6 J/cm²、0と3.2 J/cm²、0と4.8 J/cm²、3.2と4.8 J/cm²との間で、それぞれ0.0026、0.0040、0.00066、0.61となり、0と1.6 J/cm²、0と3.2 J/cm²、0と4.8 J/cm²の間では有意差が認められ、3.2と4.8 J/cm²の間では有意差は認められなかった(表3)。標準誤差は表2のようになり、0、1.3、2.6 J/cm²では、0.0060、0.024、0.021であったが、4.8 J/cm²では0.13と前者よりも大きかった。

表 2 実験 2 におけるファストプランツの突然変異頻度の平均値と標本数、標準誤差

線量[J/cm ²]	0	1.6	3.2	4.8
突然変異頻度の平均値(×10 ⁻²)	6.3	15	23	37
標本数 <i>n</i>	8	6	4	6
標準誤差 <i>SE</i> (×10 ⁻²)	±6.0	±2.4	±2.1	±13

表3 実験2の2群間でのp値

対象区線量[J/cm ²]	調査区線量[J/cm ²]	p値
	1.6	0.026
0	3.2	0.0040
	4.8	0.00066
3.2	4.8	0.60

Mann-Whitney U検定を行った結果を示したものである。

4.8 J/cm²では標準誤差が0.13となり、0、1.6、3.2 J/cm²よりも大きくなったため、細胞死が多く生じ、突然変異がさほど多く検出できない場合もあった可能性が示唆された。また、3.2と4.8 J/cm²の間ではp値が0.61で有意水準5%で有意差が認められなかったことから、3.2 J/cm²より線量を増やしても突然変異頻度は増加しないことが考えられる。これらのことから、UV-Cをアブラナ科植物の品種改良に用いる場合、細胞死が少なく、安定的に変異誘導することができる3.2 J/cm²程度が最適条件であることが示唆された。

4. 結論

ANZ 遺伝子をマーカーとして、アブラナ科植物ファストプランツにおける突然変異検出の実験系を構築するという本研究の第一の目的を達成できた。

UV-Cをアブラナ科植物の突然変異に用いる際の線量は、4.8 J/cm²では標準誤差が大きく、細胞死が起きたと考えられたため、突然変異頻度が大きく、標準誤差が小さい3.2 J/cm²が適切であることが示唆された。一方、月や火星においては、地表にはほとんど到達していないUV-Cが大量に降り注ぐことになる。また、本研究で非常に高い変異原性を示したUV-C以外にもX線などの放射線の影響も生じることを考えると、月や火星における農業を行う場合は、UV-Cや放射線を遮蔽した屋内での栽培により、これらを極力、低線量にすることが好ましいと考えられた。

UV-Bについては線量を変化させても突然変異頻度はほとんど変化しなかったため、うどんこ病やハダニの増殖抑制に突然変異を誘発せずに活用できることが示唆された。以上より、今回の研究では、紫外線UV-B、UV-Cによるアブラナ科植物ファストプランツへの影響を評価するという第二の目的も達成できた。

謝辞

本研究で使用したUV-B電球形蛍光灯(SPWFD24UB2PB)を提供して頂いたパナソニックライティングデバイス株式会社に、この場を借りてお礼申し上げます。

引用及び参考文献

Kanda Y (2013):Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation*.

48;p452-458.

Olga Sztatelman, Joanna Grzyb, HalinaGabryś, Agnieszka Katarzyna Banaś(2015) The effect of UV-B on *Arabidopsis* leaves depends on light conditions after treatment, *BMC Plant Biology*, 15(281),p1-16.

有元倫子, 長谷部匡昭, 山田真, 青木慎一, 江波義成 (2014) UV-B 夜間照射によるイチゴうどんこ病防除効果 — 照度・照射時間の検討—, 関西病虫研報, 56, p75-76.

大西武雄(1986) 近紫外線によるDNA損傷とその修復, *生物物理*, 26(1), p11-19.

環境省(2008) 平成19年度オゾン層等の監視結果に関する年次報告書

神頭武嗣・松浦克成・小河拓也・宇佐美俊行・雨宮良幹 (2011) 紫外光(UV-B)照射によるイチゴうどんこ病の防除. *植物防疫* 65: 28-32.

刑部正博(2019) UV-B照射によるハダニ類の防除メカニズムと環境要因, *植物防疫*, 73(11),p675-679.

高橋直紀, 梅田正明(2016) 植物のDNA損傷応答, *化学と生物*, 54(2), p123-129.

村田康允, 刑部正博(2014) ハダニに対するUVBの致死効果と光回復, *植物防疫*, 68(9), p28-32.

山口博康(2012), イオンビームおよびガンマ線による突然変異育種に関する研究, *花き研報*, 12, p47-83.

FAST PLANTS web サイト(2024年2月12日確認)
<http://www.fastplants.jp/>

秋田県 web サイト(2024年5月31日確認)
<https://www.pref.akita.lg.jp/pages/archive/73119>

パナソニックライティングデバイス株式会社 web サイト(2024年2月12日確認)
<https://panasonic.co.jp/ew/pldv/f-products/UV-B/>