

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00561

研究課題名(和文)半数体植物を利用した植物のゲノム安定性維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism for plant genome maintenance by means of a haploid moss plant

研究代表者

坂本 綾子 (Sakamoto, Ayako)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員(定常)

研究者番号：00354960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物のDNA損傷応答や修復・突然変異機構の特徴を明らかにする目的で、陸上植物の祖先種に近いヒメツリガネゴケを用いて線に対する感受性と生成するDNA二重鎖切断(DSB)を測定した。その結果、ヒメツリガネゴケはDSBが生じにくく、かつ生じたDSBに対して耐性を示すことがわかった。また、シロイヌナズナの放射線応答に関わるNAC型転写因子SOG1のヒメツリガネゴケホモログを特定し、これらの遺伝子の二重欠失変異(sog1a sog1b)を作成して放射線応答に対するトランスクリプトームの変化を解析した結果、sog1a sog1bでは、線照射後の遺伝子の発現に大きな変化が見られることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は動物よりも放射線に強いと言われていたが、同一の条件で比較できるデータはほとんど存在しなかった。今回、コケ植物由来のプロトプラスを用いて単一細胞における感受性を解析した結果、コケ細胞が哺乳動物細胞に比べて極めて放射線に強いことを実際に示すことができた。

SOG1は植物界のみに存在するNAC型転写因子のひとつであり、哺乳動物のp53と同様に放射線応答で中心的な役割を持つことがわかっている。今回、ヒメツリガネゴケのSOG1ホモログが放射線応答に関与することが明らかになり、植物独自の応答機構が陸上植物の誕生よりも早い段階で獲得された可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to characterize the mechanisms of DNA damage response, DNA repair, and mutagenesis in plant kingdom, *Physcomitrella patens*, an evolutionary ancestor species of modern terrestrial plants, was used as a model organism. We first irradiated it with γ -rays to quantify the formation of DNA double-strand breaks (DSBs). In comparison with yeast and human cells, we found that the number of DSBs induced are smaller in *P. patens*, and that *P. patens* is hyper-tolerant to the presence of DSBs. We next identified two *P. patens* homologues of SUPPRESSOR OF GAMMA 1 (SOG1), a NAC-type transcription factor involved in DNA damage response in *Arabidopsis*. We further generated a double knock-out mutant (sog1a sog1b) line of *P. patens* using the CRISPR/Cas9 system. Transcriptome analysis of γ -irradiated double mutant cells showed that absence of both SOG1a and SOG1b significantly reduced the expression of a series of DNA repair genes.

研究分野：生物学

キーワード：ヒメツリガネゴケ ガンマ線 DNA修復 転写因子 放射線応答 p53カウンターパート

1. 研究開始当初の背景

植物と動物では多くの DNA 複製や修復に関わる遺伝子が共通している一方で、生命維持の根幹となるような重要な機能が全く異なるメカニズムで支配されている例も見つかっている。陸上植物の祖先に近い形質をもつコケ植物(セン類)の一種ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) は生活環のほとんどが単相(n)の配偶体世代であり、変異細胞由来の細胞をコロニーとして増殖・継代できる。また高い相同組換え活性のため遺伝子破壊が容易である。このようなヒメツリガネゴケの利点を活用することで、植物における DNA 修復機構・ゲノム維持機構の研究の新たな突破口となることが期待された。

シロイヌナズナで発見された *SOG1* は、植物界のみに存在する NAC 型転写因子をコードしており、動物のがん抑制遺伝子として知られている p53 と同様に放射線照射後のプログラム細胞死や修復遺伝子の活性化に関わることが示唆されている^①。本研究でヒメツリガネゴケ *SOG1* の単離と機能解析を行うことで、高等植物における *SOG1* の機能の進化を明らかにすることが期待された。

2. 研究の目的

ヒメツリガネゴケのプロトプラストに対して放射線を照射し、生存率に及ぼす効果や DNA 二重鎖切断の生成効率を解析することで植物の DNA 損傷応答や修復機構の特徴を明らかにする。また、ゲノムデータベースの情報とゲノム編集技術を活用することで DNA 損傷応答に関わる遺伝子の破壊株を作成し、DNA 損傷処理に対する応答を動物や高等植物と比較することで、植物に特異的なゲノム維持機構がどのようにして獲得されたのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プロトプラストを利用した放射線応答反応の解析

ヒメツリガネゴケ原系体細胞をホモジナイザーで細断した後にセルロース分解処理を行い、プロトプラストを得る。このプロトプラストに ⁶⁰Co 由来のγ線を照射した後に培養し、コロニー形成能を指標に感受性を数値化する。さらに、プロトプラストからゲノム DNA を抽出し、パルスフィールドゲル電気泳動で DNA の断片化度を計測する。

(2) *SOG1* 遺伝子の同定と破壊

シロイヌナズナ *SOG1* のアミノ酸配列を利用してヒメツリガネゴケの全ゲノム配列を検索することにより *SOG1* ホモログを同定する。保存されたドメインを標的に sgRNA をデザインし、植物プロモーターにつなげてプラスミドにクローニングする。このプラスミドを Cas9 遺伝子発現プラスミド (pCas9) とともにヒメツリガネゴケのプロトプラストに導入し、薬剤耐性を指標にスクリーニングする^②。

(3) *sog1* 欠損株の感受性試験

野生株と *sog1* 欠損株に放射線を照射し、感受性に差があるかどうかを比較する。また放射線照射した組織から全 RNA を抽出し、主要な DNA 修復遺伝子の発現に差があるかどうかを RT-PCR 法などで解析する。

(4) 放射線応答遺伝子の網羅的解析

野生株および *SOG1* 欠損株にγ線を照射し、一定時間後に全 RNA を抽出して次世代シーケンサーで解析する。得られた生データをもとに放射線照射によって発現が変化する遺伝子群を分類し、プロファイリングを行う。

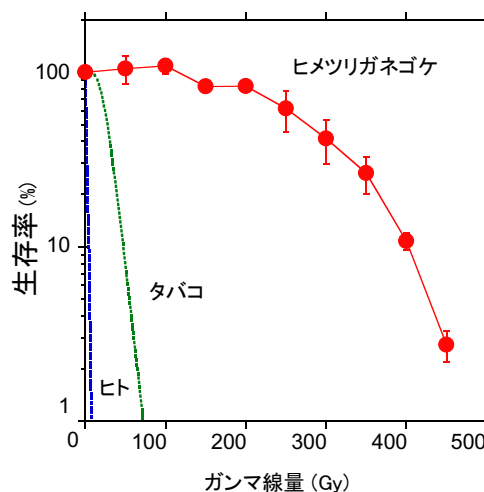


図1 ヒト、タバコ、及びヒメツリガネゴケ細胞の生存率に及ぼすγ線の効果

4. 研究成果

(1) 放射線応答反応の解析

ヒメツリガネゴケのプロトプラストにγ線処理を行った後に培養し、コロニー形成能を指標に感受性を数値化した。その結果、ヒメツリガネゴケはγ線に対して超耐性を示すことが明らかになった(図1)。また、パルスフィールドゲル電気泳動で DNA 二重鎖切断(DSB)を定量した結果、ヒメツリガネゴケは動物細胞や酵母と比べ同じ線量のγ線を浴びても DSB が生成されにくく、かつ

表1 ヒメツリガネゴケ及び他の生物における DNA 二重鎖切断(DSB)生成数と半致死線量の比較

細胞種	DSB 生成数 (Gb ⁻¹ Gy ⁻¹)	ゲノムあたりの DNA 量 (Gb Cell ⁻¹)	半致死線量 (Gy)	半致死線量で生じる DSB 数
<i>P. patens</i>	2.2	0.511	277	311
Tobacco	2.0	12.3	27	664
CHO	6.6	6.0	2.5	99
Yeast	5.4	0.024	400	52

多数の DSB が生じる条件下でも生存できることが明らかになった(表 1)^③。

(2) *SOG1* 遺伝子の同定と破壊

シロイヌナズナ *SOG1* のアミノ酸配列を利用して植物ゲノム情報のデータベースサイト Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) で BLAST 検索を行った結果、2 つの候補遺伝子 (*PpSOG1a*, *PpSOG1b*) を得た。保存されている NAC ドメインを標的に *PpSOG1a* および *PpSOG1b* を標的とした sgRNA をそれぞれデザインした。sgRNA はヒメツリガネゴケの U6 プロモーターの下流に繋げたものを人工合成し、Cas9 を発現するプラスミド (pCas9)、ジェネティシン耐性遺伝子発現プラスミドとともにプロトプラストに導入した(図 2)。細胞をジェネティシン入りの培地でスクリーニングすることにより、*sog1a* および *sog1b* 変異体を得た。また、*sog1a* 株由来のプロトプラストに *PpSOG1b* を標的とした sgRNA を導入することにより、二重欠損株(*sog1a sog1b*)を得た。

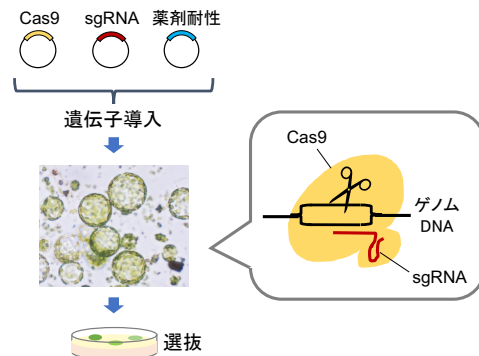


図 2 ゲノム編集による *SOG1* 遺伝子の破壊
プロトプラストに対して 3 種のプラスミドを導入し Cas9 と sgRNA による標的配列特異的な切断を利用して *SOG1* の破壊を行った。

(3) 欠損株の感受性試験

野生株および *sog1a sog1b* 二重欠損変異株の原糸体をホモジナイズし、220 MeV カーボンイオンビームを照射後、育成培地上で 12-14 日間培養し生重量を計測した。その結果、*sog1a sog1b* 二重欠損変異株と野生株では、放射線に対する感受性に大きな差がないことが明らかになった(図 3)。

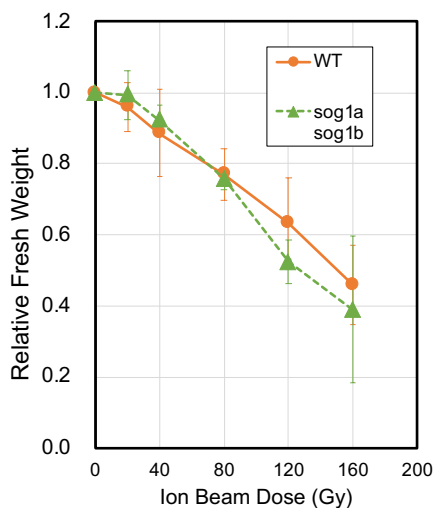


図 3 野生株(WT)及び *sog1a sog1b* 二重変異体の成長に及ぼすカーボンイオンビームの効果

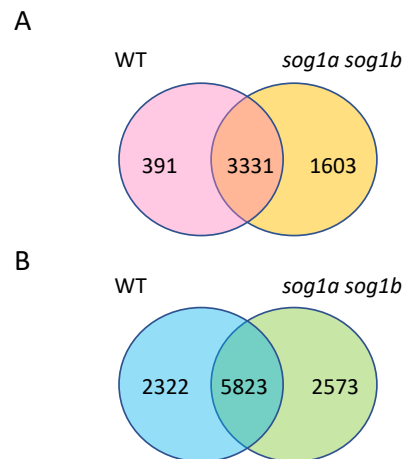


図 4 野生株(WT)及び *sog1a sog1b* 系統における γ 線応答遺伝子の解析
 γ 線照射によって発現が誘導 (A) または抑制 (B) された遺伝子の数を示す。

(4) 放射線応答遺伝子の網羅的解析

γ 線処理後 2 時間の細胞塊より RNA を抽出し、主要な DNA 修復遺伝子補発現に差があるかどうかを解析した。その結果、野生株では照射後 1.5~3 時間の時点で *XPF*, *POLQ*, *LIG4* などの DNA 修復遺伝子の発現が強く誘導されるのに対し、*sog1a sog1b* 二重欠損変異株では発現誘導が抑制されていることがわかった。

野生株および *sog1a sog1b* 株に 200 Gy の γ 線を照射し、2 時間後に全 RNA を抽出し次世代シーケンサーで全転写産物を解読した。得られたデータをもとに野生株および *sog1a sog1b* 株で γ 線照射によって発現が 2 倍以上変化した遺伝子群を抽出した。その結果、野生株と *sog1a sog1b* 株で異なった反応を示す遺伝子群が検出された(図 4)。

<引用文献>

- ① Yoshiyama KO et al (2013) *Biology* 2(4):1338-1356.
- ② Collonnier C, et al (2017) *Plant Biotechnol J.* 15(1):122-131.
- ③ Yokota Y and Sakamoto AN (2018) *Genes* 9(2):76.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Balestrazzi A, Yoshiyama KO, Sakamoto AN	4. 巻 11
2. 論文標題 Editorial: The Maintenance of Genome Integrity in Plants: Novel Challenges in Basic and Applied Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fpls.2020.00585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakamoto AN	4. 巻 10
2. 論文標題 Translesion synthesis in plants: ultraviolet resistance and beyond	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 1208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matuo Y, Izumi Y, Sakamoto AN, Hase Y, Satoh K, Shimizu K	4. 巻 3
2. 論文標題 Molecular analysis of carbon ion-induced mutations in DNA repair-deficient strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Quantum Beam Sci.	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/qubs3030014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto AN, Kaya Y and Endo M	4. 巻 13
2. 論文標題 Deletion of TLS polymerases promotes homologous recombination in Arabidopsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e1483673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1483673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Y and Sakamoto AN	4. 巻 9
2. 論文標題 The moss physcomitrella patens Is hyperresistant to DNA double-strand breaks induced by gamma-irradiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/genes9020076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 横田 裕一郎、坂本 綾子
2. 発表標題 半数性モデル植物ヒメツリガネゴケのDNA2本鎖切断修復における相同組換え経路の寄与
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakamoto AN, Nogue F, and Yokota Y
2. 発表標題 Analysis of DNA damage responses in gamma-irradiated Physcomitrella patens cells
3. 学会等名 EMBO workshop "Plant Genome Stability and Change 2018" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横田 裕一郎, Fabien Nogue, 坂本 綾子
2. 発表標題 半数性モデル植物ヒメツリガネゴケの放射線抵抗性には末端結合修復ではなく相同組換え修復が寄与する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横田 裕一郎、坂本 綾子
2. 発表標題 モデル植物ヒメツリガネゴケは100 Gyのガンマ線照射後も増殖能が全く低下しない
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横田 裕一郎 (Yokota Yuichiro) (30391288)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員(定常) (82502)	
研究協力者	Nogue Fabien (Nogue Fabien)		
研究協力者	Balestrazzi Alma (Balestrazzi Alma)		
連携研究者	清水 喜久雄 (Shimizu Kikuo) (20162696)	大阪大学・ラジオアイソトープ総合センター・准教授 (14401)	