

令和元年6月20日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19250

研究課題名(和文)植物のDNA複製開始点の同定と動態解析

研究課題名(英文)Identification of the DNA replication origin in Arabidopsis

研究代表者

金 鍾明 (Kim, Jong-Myong)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：90415141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物のDNA複製開始点認識複合体のサブユニット一つをコードする遺伝子破壊株をシロイヌナズナを用いて初めて単離した。この破壊株を用いて解析を行ったところ、DNA複製の停滞を示すS期遅延が確認された。また、DNA複製の遅延に起因する根や花茎の伸長などに関する形態学的な表現型をいくつか確認した。また、このタンパク質のゲノムワイドな結合解析の結果から、DNA複製開始点の候補となるゲノム領域を絞りこむことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA複製は、細胞の倍加、個体の成長、組織の発達などの現象において、非常に重要な生物学的イベントである。本研究成果は、これまでに全く研究、解析が進んでいなかった植物のDNA複製研究の出発点となる。この成果より、植物の発生、分化に関する研究と理解がより深まるだけでなく、ゲノムの倍加調節や人工染色体の作出など、植物資源の生産性を向上させる応用的な研究の展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We isolated the mutant of gene coded a subunit of origin recognition protein complex in Arabidopsis thaliana. From the result of cell cycle progression analysis, the mutant showed S phase arrest. This mutant also showed elongation delayed phenotype in roots and stems. It is considered that these phenotype are derived from delay of DNA replication. By using genome wide protein binding analysis, we picked up some candidates of genome region considered with the replication origin in Arabidopsis thaliana.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物の増殖と成長には細胞の分裂をともなう。DNA 複製は細胞の分裂・分化にカップリングした必須のイベントである。細菌、酵母からヒトに至るまで、ゲノム DNA の複製プロセス開始領域 (DNA 複製開始起点) がゲノム上で決まっており、どんな生物でもこの起点から DNA の複製倍加プロセスがスタートする。真核生物において、出芽酵母をはじめとしてヒトなどの重要モデル生物では、DNA 複製および細胞周期に関する研究が大いに進展している。しかしながら、植物における DNA 複製研究は全く進んでいない。その大きな理由として、体内の多くの組織で細胞分裂と細胞新生が起こるヒトなどの哺乳類や、活発に細胞増殖を繰り返す単細胞真核生物の出芽酵母と違い、植物では細胞分裂をともなう DNA 複製は根端や茎頂などの成長点に限られており、また分化した細胞は再び分裂することなく組織再生も起きにくい。この植物の特徴ともいべき点は、逆に、植物の DNA 複製研究を困難なものにしてきた。これまでに、正確な植物の DNA 複製開始起点の同定をなし得た者は誰もいない。酵母やヒトの DNA 複製研究がガン研究などの進展に福音をもたらしたように、植物の DNA 複製開始起点の同定・単離は、その後の様々な研究に大きな発展をもたらすブレークスルーになることに疑いの余地はない。この成果から、植物の DNA 複製研究、細胞周期研究のみならず、発生や形態形成などの基礎研究、植物の成長制御と増産制御を可能にするバイオマスの増大、食料生産、環境応答などの応用研究が飛躍的に進むと期待できる。

### 2. 研究の目的

植物エピジェネティクス・クロマチン研究の成果から確立したゲノム上のタンパク質結合を検出する最も有効な方法「植物に最適化したクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)」と上記変異体の解析をカップルさせ、植物 DNA 複製開始起点の同定を進める。

<1> *AtORC1a* 遺伝子の組織特異的な発現解析を行う。

<2> *atorc1* 遺伝子変異株を用いた、個体の発生・成長に伴うより詳細な表現型の解析を行う。

<3> *AtORC1a*-GFP タンパク質を用いて ChIP-seq 法によりシロイヌナズナのゲノムワイドな DNA 複製起点を同定する。

<4> 同定された DNA 複製起点を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により破壊し、分裂と成長に実際に機能する複製起点の活性を調べる。

### 3. 研究の方法

<1> *AtORC1a* 遺伝子の組織特異的な発現解析:

*AtORC1a/b* 遺伝子それぞれの発生にともなう植物体内の発現部位と発現パターンについて調べるため、それぞれの遺伝子についてプロモーター-GUS 解析を行う。

<2> *atorc1* 遺伝子変異株を用いた、個体の発生・成長に伴う表現型解析:

DNA 複製異常がもたらす *atorc1a* 変異株のその他表現型をさらに探索する。得られた表現型については、*atorc1a* 変異株にネイティブプロモーター制御下で *AtORC1a* 遺伝子の発現誘導が可能な形質転換体 (既に作成済み) を用いて、機能と表現型の相補性を確認する。表現型が得られた組織について、フローサイトメトリー解析、また顕微鏡観察により、細胞内の核相および DNA 複製 foci 等を検出し、*AtORC1a* 遺伝子破壊による DNA 複製および染色体の異常について調べる。

<3> *AtORC1a*-GFP タンパク質の結合解析: *AtORC1a*-GFP 融合タンパク質を *atorc1a* 変異体内において *AtORC1a* 遺伝子のネイティブプロモーター制御下で発現させ、染色体上の結合部位を ChIP-seq 法によりゲノムワイドに検出する。このデータに対してイフォマティクス手法を用い

塩基配列およびゲノム上の位置を決定する。タンパク質を用いたシロイヌナズナ DNA 複製起点の同定を試みる。

#### <4> 同定した DNA 複製開始点の機能解析

CRISPR/cas9 ゲノム編集法で DNA 複製開始点を破壊した破壊株に対して、分裂と成長に対する各複製起点の活性について表現型変化をモニターして調べる。

#### 4 . 研究成果

植物のDNA複製開始点解明は、細胞周期、形態形成、脱分化と再生などの植物基礎研究の飛躍につながるだけでなく、バイオマス増大、植物資源の維持、環境適応、植物材料からの医薬品開発など応用面においても広範囲に波及する。本課題ではシロイヌナズナを用いて「植物のゲノムワイドなDNA複製起点の同定と機能解析」を目指しており、本年度は以下の計画計画にしたがって進めた。

< AtORC1a遺伝子変異株の表現型解析 > AtORC1a遺伝子変異株を用いて、形態および成長に呼応した表現型の検索をさらに行い、DNA複製の遅延が原因と考えられる、新たな作用点を見出した。表現型解析の結果、GFP融合タンパク質を用いた局在解析の結果、AtORC1aとAtORC1bタンパク質はそれぞれ核に局在するものの(図1)、またAtORC1a遺伝子破壊により、シロイヌナズナの根の伸長が大きく阻害されることがわかった(図2)。

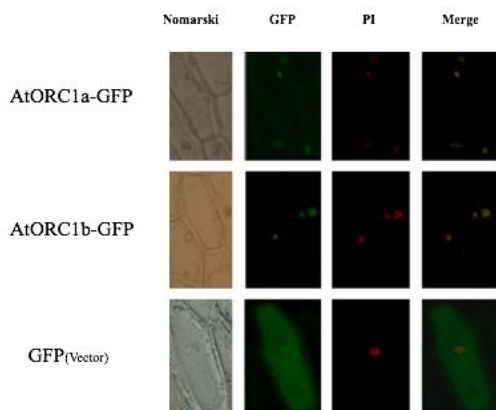


図1 AtORC1aとAtORC1b タンパク質の核局在

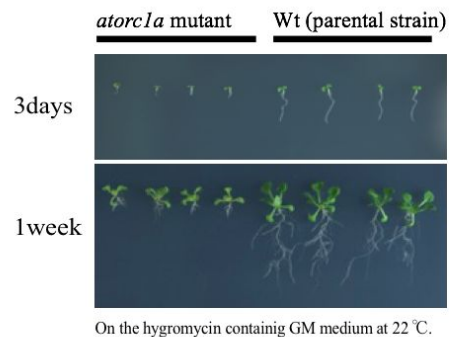


図2 AtORC1a 変異体の根における表現型

また、AtORC1aとAtORC1bの発現組織には違いがあることがわかった。

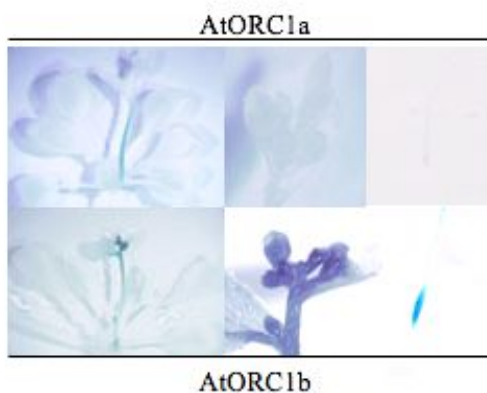


図3 AtORC1a/bの発現組織の違い

しかしながら、AtORC1a遺伝子破壊株は根の伸長遅延を表現型として示すにも関わらず、AtORC1a遺伝子の発現は根では確認できなかった。

< AtORC1a-GFPタンパク質を用いたシロイヌナズナDNA複製起点の同定 > 複製開始点認識タンパク質AtORC1aのGFP融合タンパク質をatorc1a変異体内においてAtORC1a遺伝子のネイティブプロモーター制御下で発現させる遺伝子導入株を作出し、複数の高発現ラインの選抜を行った。得られた遺伝子導入株のうち、AtORC1a遺伝子破壊株の表現型を強度に相補できるラインの選抜をさらにさらに行った。これらラインに対して、AtORC1aタンパク質の染色体上の結合部位をChIP-seq法によりゲノムワイドに検出するため、新型シーケンサー（Nanopore）を用いたChIP-seq法の最適化を進めた。 < 同定したDNA複製開始点の機能解析 > 得られたChIP-seqデータを解析し、複製開始点候補を検索を進めている。同定したDNA複製開始点候補の活性を確認するため、CRISPR/cas9ゲノム編集法によりDNA複製開始点候補の破壊株の作出を進めている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者名：Jong-Myong Kim

発表表題：Acetate-jasmonate signalling network is a novel essential mechanism for plant drought tolerance

学会名：ICAR2018

発表年月日：2018年6月28日

発表場所：Turku, Finland

発表者名：Jong-Myong Kim

発表表題：Water saving and regrowth in plants

学会名：Plant Science Seminar at University of Adelaide (招待講演)

発表年月日：2019年2月5日

発表場所：Adelaide, Australia

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。