

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12174

研究課題名(和文)植物細胞を利用したDNAポリメラーゼの新規機能の探索

研究課題名(英文) Exploring new functions of DNA polymerase zeta using plant-cell systems

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 量子バイオ基盤研究部・上席研究員

研究者番号：00354960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物のDNAポリメラーゼ (Pol ζ) はDNA二重鎖切断修復機構において何らかの機能を持つことが示唆されている。本研究では、ヒメツリガネゴケのDNA二重鎖切断修復の特徴解析、シロイヌナズナの根端メリステムの細胞死・伸長阻害におけるPol ζ の機能解析、ならびにPol ζ と相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果、ヒメツリガネゴケはおもに相同組換えによってDNA二重鎖切断を修復していること、Pol ζ 欠損植物の根端ではSOG1非依存的に細胞死が起こっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pol ζ はがん細胞の増殖や薬剤耐性獲得との関連が注目されているが、哺乳動物細胞でPol ζ を欠損させたり過剰発現させるとゲノムが不安定となることが多く、機能の同定が困難であった。本研究はPol ζ のホモ欠失や過剰発現で生存・稔性にほとんど影響がない植物細胞を利用することでPol ζ の新規機能に迫る新しい試みである。本研究で明らかになった新機能や新規Pol ζ 相互作用タンパク質などが植物以外でも保存されているならば、界を超えて普遍的なゲノムメンテナンス機構や抗がん剤抵抗性細胞の出現メカニズムなどとも共通した知見となることが見込まれる。

研究成果の概要(英文)：DNA polymerase ζ (Pol ζ) has been suggested to have (a) role(s) in DNA double strand break (DSB) repair activities. In this study, we characterized the DSB-repair mechanism in a basal land plant *Physcomitrium patens* and found that *P. patens* cells largely rely on homologous recombination (HR) pathway to repair DSBs. We also analyzed a possible function of Pol ζ in γ -ray-induced growth arrest and emergence of cell death over the *Arabidopsis* root meristems, finding that the cells in Pol ζ -KO plant undergo cell death in a SOG1-independent manner. In our screen for novel Pol ζ -interacting proteins, several candidates were detected that showed different expression patterns after γ -ray-irradiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA二重鎖切断 ヒメツリガネゴケ 相同組換え ガンマ線 DNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

DNA ポリメラーゼ ζ (Pol ζ)は、酵母、ショウジョウバエ、哺乳動物、植物など、真核生物の間で広く保存されている。酵母を用いた遺伝学的な実験では、欠損すると突然変異頻度が下がることから突然変異誘発性を持つことが示唆されてきた。その後 Pol ζ は紫外線などによって生じた DNA 損傷によって複製がストップした際に、損傷部位をバイパス複製することにより複製の停止を回避する損傷乗り越え複製に関与することが示された。さらに DNA 鎖間クロスリンク損傷をバイパス複製することから、抗がん剤治療に対する耐性化のメカニズムへの関与が報告されている。一方で、Pol ζ (-/-)マウスが胎生致死となることや、成長したマウスで Pol ζ の活性を失わせると高頻度でがんを発症するなど、既知の機能だけではうまく説明できない現象が知られている。これらのことから、Pol ζ はおそらく DNA 二重鎖切断の修復に関連した極めて重要な機能があることが予想されている。

研究代表者らは、i)植物の Pol ζ 欠損株が通常の栽培条件下では正常に成長し稔性もあること¹⁾、ii)紫外線照射により Pol ζ 欠損株では根端の伸長が抑制され¹⁾、iii)紫外線誘発突然変異頻度が野生型よりも下がることを観察し²⁾、紫外線損傷の乗り越え複製に関与することを報告した。これに加え、Pol ζ 欠損株の種子にガンマ線を照射すると生存率が大きく低下することから Pol ζ の二重鎖切断修復への関与を示唆してきた。

2. 研究の目的

本研究では DNA ポリメラーゼ ζ (Pol ζ)の新規機能を明らかにする目的で、シロイヌナズナおよびヒメツリガネゴケを材料として、(1) 植物における DNA 二重鎖切断修復プロセスの解析、(2) DNA 損傷による根端メリステムの細胞死と根の伸長阻害の測定、(3) DNA 損傷依存的に Pol ζ と相互作用するタンパク質の探索を行う。これにより Pol ζ の DNA 二重鎖切断修復への関与を明らかにし、種を超えて保存されたゲノム維持機構が存在する可能性を示す。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集による Pol ζ および DNA 修復酵素遺伝子の破壊と応答の解析

PpREV3, *PpRAD51B*, *PpPOLQ*, *PpLig4* の遺伝子配列情報を植物ゲノム情報データベース Phytozome³⁾より取得し、遺伝子破壊に至適な部位を CRISPR⁴⁾を用いて選抜した。これをもとにそれぞれの遺伝子に対して複数の gRNA をデザインし、ヒメツリガネゴケ U6 プロモーターの下流にクローニングした。このコンストラクトを Cas9 遺伝子、薬剤耐性遺伝子とともにヒメツリガネゴケのプロトプラストへ導入し、G418 を添加した培地でスクリーニングすることで破壊株を選抜した。得られた遺伝子破壊株に対してガンマ線を照射し、一定の時間培養したのちに乾燥重量を測定することで放射線に対する抵抗性を解析した。

(2) DNA 損傷による根端メリステムの細胞死と根の伸長阻害の測定

野生型シロイヌナズナ、シロイヌナズナ Pol ζ 欠損株 (*rev3*)、DNA 二本鎖切断修復遺伝子欠損株 (*ku70*, *ku80*)、DNA 損傷応答遺伝子の欠損株 (*atm*, *atr*, *sog1*)、さらに *rev3 sog1* 二重欠損株に 50Gy のガンマ線を照射し、24 時間後に根端をヨウ化プロピジウム (PI) で染色することにより、細胞死を検出した。また、野生型、*atr*、*rev3*、*sog1*、*rev3 sog1* については照射後 1 日ごとに撮影し、照射後 6 日までの根の伸長を計測した。

(3) REV7 と相互作用するタンパク質のプルダウン

Pol ζ の新規機能を解明する目的で Pol ζ の小サブユニットである REV7 と GFP との融合タンパク質を発現するコンストラクトを REV7 欠損株に導入し、マイトマイシン C 感受性がレスキューされることを確認するとともに、蛍光顕微鏡による観察で GFP 融合タンパク質がシロイヌナズナ細胞の核及び細胞質で発現することを確認した。この系統に対して 80Gy のガンマ線を照射し、24 時間培養した後にタンパク質を抽出した。これを GFP アフィニティークラムにかけて REV7 と相互作用する画分を濃縮し、SDS-PAGE で展開した。

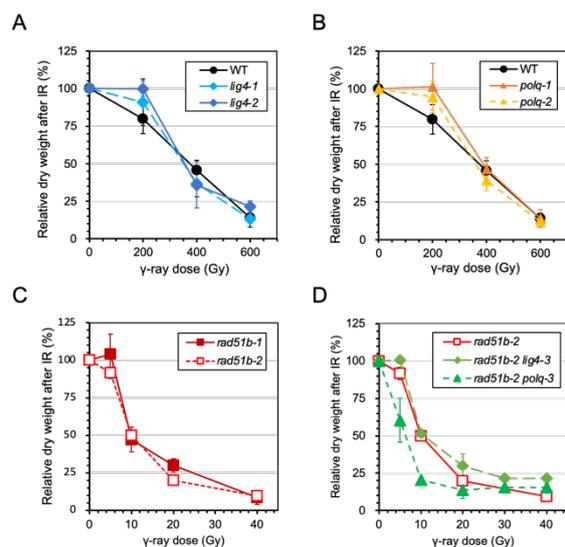


図 1 DNA 修復遺伝子破壊株のガンマ線に対する抵抗性 野生型及び *lig4* (A)、*polq* (B)、*rad51b* (C)、並びに二重変異体 (D) にガンマ線を照射し 1 週間後の乾燥重量をプロットした。

4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケの DNA 二本鎖切断を修復する機構の解析

ヒメツリガネゴケでは DNA 二本鎖切断がどのような経路で修復されているかを明らかにするため、非相同末端結合 (NHEJ)、オルタナティブエンドジョイニング (Alt-EJ)、および相同組換え (HR) で働くことが予想される *PpLig4*, *PpPOLQ*, *PpRAD51B* の遺伝子破壊株を作成し、放射線に対する抵抗性の変化を解析した。その結果、*lig4* と *polq* は野生型とほぼ同等の放射線抵抗性を示したのに対し、*rad51b* では抵抗性が大幅に低下し、10-12Gy で乾燥重量が半減となった (図 1)。さらに 2 重変異体である *rad51b lig4* と *rad51b polq* を用いた解析では、*rad51b* と *rad51b lig4* はほぼ同等の抵抗性を示したのに対し、*rad51b polq* ではさらに抵抗性が低下するという結果が得られた。このことから、ヒメツリガネゴケの DNA 二本鎖切断損傷は、大部分が相同組換え (HR) に依存して修復されていること、HR が利用できない場合はオルタナティブエンドジョイニング (Alt-EJ) の経路が主に用いられることが示唆された。

(2) DNA 損傷による根端メリステムの細胞死と Pol ζ の関係の解析

DNA 損傷時に生じる根端メリステム組織の細胞死の誘導において Pol ζ が機能しているかどうか調べるため、野生型シロイヌナズナ、Pol ζ 機能欠損変異体 (*rev3-1*)、DNA 二本鎖切断修復遺伝子欠損株 (*ku70*, *ku80*)、DNA 損傷応答遺伝子の欠損株 (*atm*, *atr*) に対してガンマ線を照射し、照射後の根の伸長を計測するとともに、根端メリステムにおける細胞死を検出した (図 2A)。さらに、高等植物の放射線応答反応で中心的な役割を果たす転写因子 SOG1 と Pol ζ との関係調べるため、*sog1-1* および *sog1 rev3* 二重変異体に対しても同様の解析を行なった。その結果、*rev3* では野生型と同様に根端で細胞死が認められたが、*sog1* では根端での細胞死は抑制された (図 2B)。一方で *rev3 sog1* では根端以外の場所で細胞死が見られた。照射後の根の伸長は *sog1* が野生型と同様であったのに対し、*rev3* では抑制され *rev3 sog1* ではほぼ完全に伸長が停止した (図 3)。これらのことから *rev3* では SOG1 に非依存的に細胞死が起こっていることが示唆された。

(3) REV7 と相互作用するタンパク質の解析

35S::GFP::REV7 導入シロイヌナズナに対して 80Gy のガンマ線を照射し、24 時間培養したのちにタンパク質画分を抽出し、GFP アフィニティーカラムで REV7 と相互作用する画分を分画した。その結果ガンマ線によって濃度に変化するバンドがいくつか検出された。今後 *rev3* バックグラウンドで同様のプルダウン実験を行うことで、REV7 と相互作用する新規蛋白質の同定を目指していきたい。

<参考資料>

- 1) Sakamoto A. *et al.*, *Plant Cell*, 2003
- 2) Nakagawa M. *et al.*, *Plant Physiol.*, 2011
- 3) <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>
- 4) <http://crispor.tefor.net/>

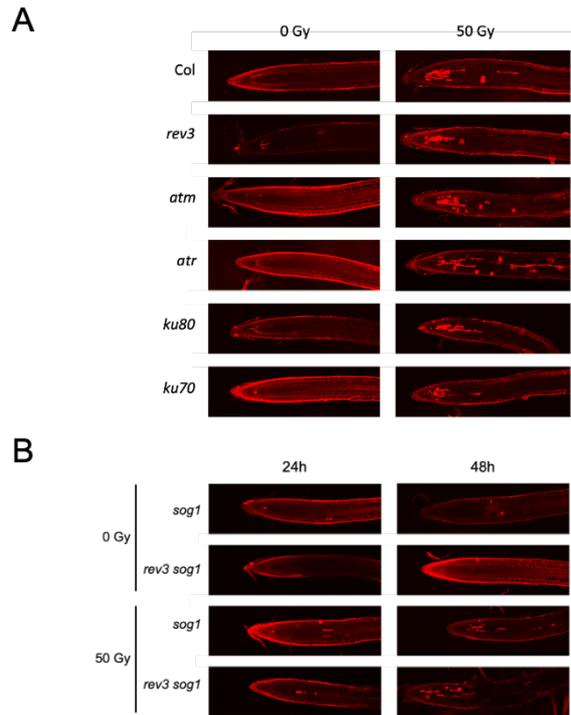


図 2 DNA 損傷による根端メリステムの細胞死 (A) 野生型、*rev3*, *ku70*, *ku80*, *atm*, *atr* に対してガンマ線を照射し 24h 後の細胞死を検出した。(B) *sog1* および *rev3 sog1* 二重変異体に対してガンマ線を照射し 24-48h 後の細胞死を検出した。

atm, *atr*) に対してガンマ線を照射し、照射後の根の伸長を計測するとともに、根端メリステムにおける細胞死を検出した (図 2A)。さらに、高等植物の放射線応答反応で中心的な役割を果たす転写因子 SOG1 と Pol ζ との関係調べるため、*sog1-1* および *sog1 rev3* 二重変異体に対しても同様の解析を行なった。その結果、*rev3* では野生型と同様に根端で細胞死が認められたが、*sog1* では根端での細胞死は抑制された (図 2B)。一方で *rev3 sog1* では根端以外の場所で細胞死が見られた。照射後の根の伸長は *sog1* が野生型と同様であったのに対し、*rev3* では抑制され *rev3 sog1* ではほぼ完全に伸長が停止した (図 3)。これらのことから *rev3* では SOG1 に非依存的に細胞死が起こっていることが示唆された。

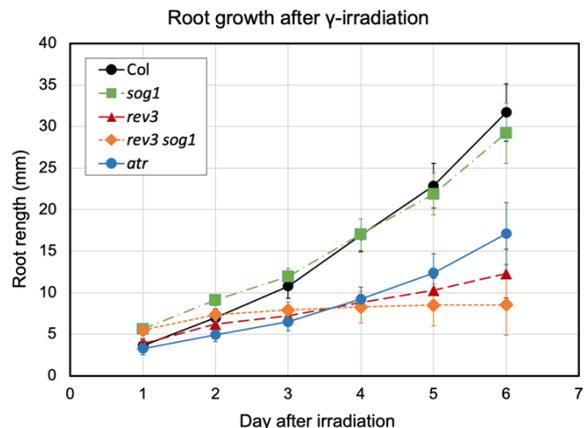


図 3 野生型、*atr*, *rev3*, *sog1*, *rev3 sog1* に対してガンマ線を照射し、照射後 1-6d の根の長さをプロットした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ayako N. Sakamoto, Tomoaki Sakamoto, Yuichiro Yokota, Mika Teranishi, Kaoru O. Yoshiyama, Seisuke Kimura	4. 巻 5
2. 論文標題 SOG1, a plant specific master regulator of DNA damage responses, originated from nonvascular land plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pld3.370	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10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayako N. Sakamoto, Yuichiro Yokota, Fabien Nogue
2. 発表標題 Analysis of radiation-induced mutations in HR-proficient and -deficient Physcomitrium patens
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayako N. Sakamoto, Yuichiro Yokota, Fabien Nogue
2. 発表標題 -ray sensitivity and mutation analysis in DSB repair-deficient moss plants
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nan Gu, Ayako N. Sakamoto, Yosuke Tamada
2. 発表標題 DNA damage-triggered reprogramming in Physcomitrium patens
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayako N. Sakamoto, Yuichiro Yokota, Fabien Nogue
2. 発表標題 The moss plant <i>Physcomitrium patens</i> depends on homologous recombination to repair DNA double strand breaks
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako N. Sakamoto, Tomoaki Sakamoto, Yuichiro Yokota, Mika Teranishi, Kaoru O. Yoshiyama, Seisuke Kimura
2. 発表標題 Disruption of SOG1 orthologues diminishes DNA damage responses in <i>Physcomitrium patens</i>
3. 学会等名 Plant genome stability and change 2020 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayako N. Sakamoto, Tomoaki Sakamoto, Yuichiro Yokota, Mika Teranishi, Seisuke Kimura
2. 発表標題 SOG1 homologues regulate DNA-damage responses in <i>Physcomitrella patens</i>
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田裕一郎、F. Nogue、大野豊、坂本綾子
2. 発表標題 相同組換え経路の破綻がヒメツリガネゴケの放射線抵抗性を喪失させる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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 (82502)	削除：2021年6月28日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	INRAE		