

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15770

研究課題名（和文）植物ホルモンによるクロマチン構造とゲノム恒常性の制御機構

研究課題名（英文）Phytohormone-mediated regulation of genome integrity

研究代表者

安喜 史織 (Aki, Shiori S)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：50747946

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物はDNA損傷を誘発するようなストレスから逃れることができないため、ゲノム安定性を維持する機構は重要であるが、植物ゲノムを損傷から守る恒常的な仕組みの理解は進んでいない。本研究では「植物ホルモンの一種であるオーキシンがクロマチン構造を制御することによりゲノム恒常性を維持する」という仮説を立て、その検証を行うことにより、ホルモンによるゲノム安定性制御という新たな概念を提示することを目標とした。本研究では、当初着目していたクロマチン制御因子と協調的に働くヒストン修飾因子の制御にオーキシンが関与することを見出し、オーキシンによりこの因子のタンパク質安定性が増すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、植物ホルモンの一つであるオーキシンがどのように植物のゲノムDNAを損傷から守るのか、その機構を解き明かすべく解析を行った。これまで植物ホルモンによるクロマチン構造の制御に関しては、ほとんどのケースで転写制御機構の一部として研究されてきたため、本研究のようにオーキシンがクロマチン構造そのものを制御することに着目した研究はほとんどない。オーキシンは植物の発生や成長制御において非常に重要なホルモンであるため、本研究により、オーキシンがもつクロマチン構造制御における機能の一端が明らかになったことで、これまでの植物発生研究で得られた知見を見直す契機となると期待される。

研究成果の概要（英文）：Proper chromatin structure is essential for genome integrity in eukaryotes, while how it is regulated to prevent genome instability remains elusive. We previously found that auxin application preserved genome stability and change chromatin structure in Arabidopsis. These results prompted us to hypothesize that auxin contributes to the maintenance of genome integrity through the control of chromatin structure. In this study, we identified epigenetic regulators that are working under auxin to maintain genome stability.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物ホルモン ゲノム恒常性

## 1. 研究開始当初の背景

動植物を問わず、ゲノム恒常性を維持できないと変異が蓄積し、体細胞および次世代に悪影響をもたらす。特に植物は固着生活を営むので、変動する環境下でいかにゲノム恒常性を維持するかは死活問題である。ゲノムを脅かすものとして、DNA複製エラーなどの内的要因があるが、植物の場合は紫外線や光合成過程で産生される活性酸素、土壌中の重金属、病原菌感染など、様々なストレスがDNA損傷を誘発する。したがって、ゲノムの傷を治すDNA修復マシナリーだけでなく、そもそも傷が入らないようにゲノムを守る仕組みも非常に重要であると考えられるが、その実体は全く解明されておらず、未解明の「問い」として残されたままであった。

植物にDNA二本鎖切断誘導剤を処理すると、幹細胞特異的に細胞死が誘導される。過去の我々の研究から、細胞死がごく微量のオーキシンを同時処理することにより抑圧でき、その際、DNA損傷レベル自体の低下も観察されることを明らかにしていた。また、オーキシンはクロマチンを凝縮させる効果をもつことを新たに見出していたことから、「オーキシンがクロマチンを凝縮させてゲノムに損傷が入らないように守っている」という仮説を立てた。この作業仮説に合うクロマチン制御因子を見出し、そのリン酸化状態がオーキシンにより制御される可能性が示されたことから、オーキシンがクロマチン制御因子のリン酸化を介してクロマチン構造を制御し、ゲノム恒常性の維持に寄与する、というモデルを提唱するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では「オーキシンがクロマチン構造を制御することによりゲノム恒常性を維持する」という仮説を検証し、植物ゲノムを損傷から守るための恒常的な仕組みの理解を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) クロマチン制御因子のリン酸化部位の同定

クロマチン制御因子のリン酸化がクロマチン凝縮やゲノム恒常性の制御に関与しているかどうか調べるため、まずクロマチン制御因子のリン酸化部位を同定する。同定したリン酸化部位をもとに非リン酸化型および疑似リン酸化型タンパク質を発現する植物を作出し、下記②～④の解析に用いる。また、同様にリン酸化部位に変異を導入したクロマチン制御因子の組換えタンパク質を作成し、*in vitro* でクロマチン制御因子の活性に及ぼす影響を調べる。

### (2) オーキシンによるクロマチン構造制御の解析

オーキシンによるクロマチン構造制御がクロマチン制御因子の経路を介しているのかどうか調べるため、オーキシン処理および各種変異体を用いてクロマチン構造を解析する。ヒストン修飾抗体を用いたChIP-seq、セントロメア領域特異的なプローブを用いた蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)、ATAC-seq、qRT-PCRによる転移因子配列の発現解析を行う。

### (3) オーキシンによるゲノム恒常性制御の解析

オーキシン処理および各種変異体をDNA損傷誘導剤で処理し、根端におけるゲノム安定性について解析する。免疫染色による $\gamma$ H2AXの蓄積、根端の幹細胞死の表現型をDNA損傷レベルの指標に用いる。

#### (4) オーキシンによりゲノム恒常性を制御するシグナル経路の検証

各種変異体を掛け合わせてオーキシンおよび DNA 損傷誘導剤で処理し、DNA 損傷レベルを比較することで、仮説のシグナル経路が関与していることを遺伝学的に証明する。

#### 4. 研究成果

本研究では、当初着目していたクロマチン制御因子と協調的に働くヒストン修飾因子の制御にオーキシンが関与することを見出した。ヒストン修飾因子の変異体では、野生株で見られるようなオーキシン処理によるクロマチン構造の変化が見られず、DNA 損傷の緩和も起こらなかった。さらに、このヒストン修飾因子がオーキシンによりどのように制御されるのかを検証するべく解析を進めたところ、オーキシン処理によりタンパク質の安定性が増すことを明らかにした。また、このヒストン修飾因子のタンパク質安定性の制御に関わる候補タンパク質を同定し、その変異体においてヒストン修飾因子のタンパク質が過剰に蓄積すること、また *in vitro* でこれらが直接結合することを明らかにした。当初予定していたクロマチン制御因子のリン酸化を介したメカニズムについてはリン酸化部位の同定が難航したため解析がなかなか進まなかったが、解析中に新たに見出した新規因子の解析が進んだことでオーキシンによるクロマチン制御を介したゲノム安定性維持機構の一端を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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<br>Shimotohno Akie, Aki Shiori S., Takahashi Naoki, Umeda Masaaki                  | 4. 巻<br>72      |
| 2. 論文標題<br>Regulation of the Plant Cell Cycle in Response to Hormones and the Environment | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Annual Review of Plant Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1146/annurev-arplant-080720-103739                          | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Moo Kar Yee, Akiko Masada, Haruka Manabe, Hiroto Takatsuka, Shiori S Aki, Masaaki Umeda          |
| 2. 発表標題<br>Control of DNA replication by histone methyltransferases ATXR5 and ATXR6 in Arabidopsis thaliana |
| 3. 学会等名<br>第64回日本植物生理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>賀 鐘寛, 正田 晃子, ムー カーイー, 岩田 悠暉, 安喜 史織, 梅田 正明                            |
| 2. 発表標題<br>Mechanisms of endocycle induction by controlling histone methylation |
| 3. 学会等名<br>第64回日本植物生理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hiroto Takatsuka, Shiori S. Aki, Masaaki Umeda                    |
| 2. 発表標題<br>Chromatin-level regulation of endoreplication onset               |
| 3. 学会等名<br>31st INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>安喜 史織、梅田 正明        |
| 2. 発表標題<br>オーキシンによるゲノム恒常性維持機構 |
| 3. 学会等名<br>第63回日本植物生理学会年会     |
| 4. 発表年<br>2022年               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Moo Kar Yee, Akiko Masada, Haruka Manabe, Hirotomo Takatsuka, Shiori S Aki, Masaaki Umeda |
| 2. 発表標題<br>Proteolysis of histone methyltransferases controls cell cycle progression in Arabidopsis  |
| 3. 学会等名<br>第63回日本植物生理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>安喜 史織、梅田 正明              |
| 2. 発表標題<br>オーキシンを介したヘテロクロマチン形成の制御機構 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本植物生理学会年会           |
| 4. 発表年<br>2021年                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|