

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：	34304
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011年度～2012年度
課題番号：	23770207
研究課題名（和文）	植物が独自に獲得したDNAダメージチェックポイント機構の解明
研究課題名（英文）	Uncovering the mechanisms of DNA damage checkpoint unique to plants
研究代表者	
	愿山 郁 (YOSHIYAMA KAORU)
	京都産業大学・総合生命科学部・特定研究員(PD)
	研究者番号：10346322

研究成果の概要（和文）：本研究では、シロイヌナズナのDNAダメージレスポンスにおいて主要な役割を担っている、転写因子SOG1の活性化メカニズムとその意義の解明を試み、ゲノムDNAにダメージが生じると、SOG1はATMキナーゼ依存的に高リン酸化されることを明らかにした。またそのリン酸化は、細胞周期の停止、DNAダメージ依存的な遺伝子発現の誘導、そしてプログラムされた細胞死といった様々なレスポンスの誘導に重要な事であった。植物SOG1と動物ガン抑制遺伝子p53は、アミノ酸配列が全く異なるにもかかわらず、それらの働きや活性化メカニズムは良く似ており、今回の結果は大変興味深い。

研究成果の概要（英文）：DNA damage checkpoint system is crucial to maintain genome stability. We have previously identified and analyzed *Arabidopsis* SOG1, which is a plant-specific transcription factor, governs DNA damage response. SOG1 is the only known DNA repair-/DNA damage response-related transcription factor that is unique to plants. In this study, we investigated the mechanism of activation of SOG1. We demonstrated that SOG1 is phosphorylated in an ATM-dependent manner, and that this phosphorylation is essential for cell cycle arrest, transcriptional regulation, and programmed cell death. We have previously reported that, although the amino acid sequence of SOG1 is completely different from that of the mammalian tumor suppressor p53, their functions and roles in DNA damage checkpoint are quite similar. Our current study illuminates new aspects of the regulatory mechanisms of SOG1 functions which are mostly similar to properties of p53.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA損傷・修復

## 1. 研究開始当初の背景

DNAダメージチェックポイントとは、DNA上のダメージをモニターし、それらの

問題が解決されるまでのあいだ細胞周期の進行を止める重要な仕組みである。細胞がチェックポイントを失うと、ゲノム上の問題が解決されないまま細胞周期が進行してしま

うため、ゲノムを安定に維持出来なくなる。動物のチェックポイント制御において中心的な働きをしている ATM や ATR はタンパク質キナーゼであり、ダメージの認識から DNA 修復や細胞分裂停止に関与する遺伝子群の活性化といったシグナル伝達を統括している。これまでに、動物の ATM や ATR のホモログがシロイヌナズナで見つかったが、その下流因子であるメディエータータンパク質は見つかっていなかった。よって、植物が DNA ダメージに応答して、どのようにチェックポイントを制御しているのかは不明であった。しかし我々は、植物にのみ存在する SOG1 が、DNA ダメージに応答した細胞周期の停止、100 以上の遺伝子の転写誘導、プログラムされた細胞死を制御する、マスターレギュレーターとして働く転写因子であることを示してきた。さらに我々は、SOG1 は動物 p53 とはアミノ酸配列的な類似性が全くないにも関わらず、その機能は p53 と共通点が多いことも示した。これらのことから、植物は動物のシステムと独自のシステムを取り入れることで、自らに適した DNA チェックポイントを獲得してきたと考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでの植物における DNA チェックポイントの研究は、動物に存在するチェックポイントタンパクのホモログを探すといった逆遺伝学的な手法が主流であったため、植物にしか存在しない DNA チェックポイント因子を発見するのは難しかった。しかし、我々は植物だけに存在する SOG1 の単離に成功したことで、植物が独自に獲得した DNA チェックポイントを明らかにするための手がかりを掴むことが出来た。本研究では、このような植物のみに存在する SOG1 タンパク質を研究のコアとし、DNA ダメージシグナル伝達の分子メカニズムや、SOG1 との相互作用因子を明らかにすることで、植物が進化の中で獲得した独自の DNA チェックポイント機構の全体像を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA ダメージシグナル伝達の分子メカニズムの解明

我々はこれまでに SOG1 タンパク質が DNA ダメージに依存してなんらかの修飾を受ける事を明らかにして来た。そこで本研究ではまず、①SOG1 タンパク質が受けている

修飾の種類を明らかにした。まずはリン酸化の可能性を考え、リン酸化されているタンパク質の移動度を変化させることが出来る Phos-tag を用いた SDS-page を行った。次に②DNA ダメージ依存的に SOG1 タンパク質を修飾している因子を同定した。また、③SOG1 タンパク質の修飾部位を同定した。そして、④DNA ダメージチェックポイントにおける、SOG1 タンパク質の修飾の意義を明らかにした。

### (2) SOG1 タンパク質と相互作用する因子の単離

SOG1-Myc コンストラクトが導入された植物体を用いて、DNA ダメージ誘導剤であるゼオシンで処理した植物体と、処理していない植物体からタンパク質を抽出し、Myc 抗体で SOG1 と共免疫沈降 (Co-IP) してきたタンパク質を質量分析計により解析することで、DNA ダメージに応答して SOG1 と相互作用するタンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) DNA ダメージシグナル伝達の分子メカニズムの解明

#### ① SOG1 タンパク質の修飾解析

SOG1-Myc コンストラクトが導入された野生型シロイヌナズナをガンマ線照射し、照射していないコントロールと共にタンパク質を抽出した。そのタンパク抽出液を Phos-tag 入りの SDS-PAGE で分離した後、Myc 抗体でウェスタンブロットすることで SOG1 タンパク質を検出した。その結果、ガンマ線照射されていないコントロールの植物体から抽出した SOG1 に比べて、ガンマ線照射した植物体の SOG1 は高リン酸化されていることが明らかになった (図 1 バンド c)。また、ラムダ脱リン酸化酵素 ( $\lambda$ PP) を用いて、DNA ダメージに依存して現れたバンドが本当にリン酸化されたものかを検討したところ、 $\lambda$ PP 処理したサンプルでは、ゼオシン処理依存的に現れていたバンドが消失していたが、 $\lambda$ PP 阻害剤を同時に加えたサンプルでは、そのバンド

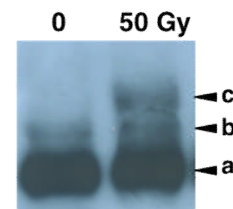


図1:ガンマ線照射に応答したSOG1のリン酸化  
a:SOG1-Myc, b:リン酸化されたSOG1-Myc, c:高リン酸化されたSOG1-Myc

が再び現れた (図 2)。この結果から、SOG1 は DNA ダメージが生じると高リン酸化され

ることが確かとなった。

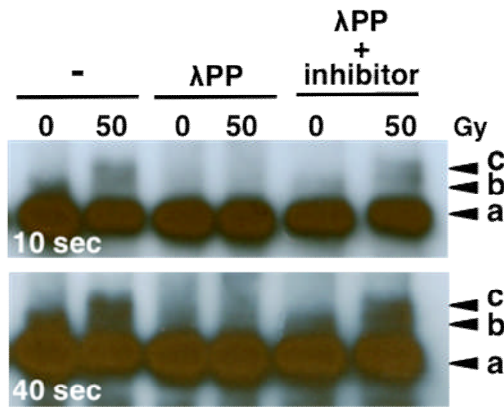


図2: SOG1リン酸化の確認  
 $\lambda$  PP:  $\lambda$  protein phosphatase  
 a: SOG1-Myc, b: リン酸化されたSOG1-Myc, c: 高リン酸化されたSOG1-Myc

### ② SOG1 タンパク質をリン酸化している因子の同定

動物の ATM はアミノ酸 SQ (Serin/Glutamine) 配列の S をリン酸化することが報告されている。SOG1 アミノ酸配列の C 末端には 5 つの SQ モチーフが存在するため、SOG1 もシロイヌナズナの ATM によってリン酸化されている可能性が考えられた。そこで、*atm-2* 変異体に *SOG1-Myc* コンストラクトを導入した植物体を作製し、DNA 二本鎖切断誘発剤のゼオシンで処理した後、SOG1 のリン酸化状態を調べた。すると *atm-2* 変異体では DNA ダメージに依存した SOG1 の高リン酸化が完全に消失していた (図 3)。これは DNA ダメージに依存した

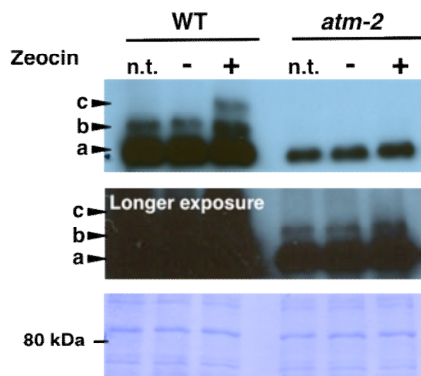


図3: 野生型と *atm-2* 変異体における SOG1 のリン酸化  
 5-day-old シードリングを移し替えなかったもの (n.t.)、薬剤の入っていない MS プレートに移し替えたもの (-)、Zeocin の入ったプレートに移し替えたもの (+)。a: SOG1-Myc, b: リン酸化された SOG1-Myc, c: 高リン酸化された SOG1-Myc

SOG1 の高リン酸化が ATM タンパク質に依存していることを意味していた。

### ③ SOG1 リン酸化部位の同定

SOG1 のリン酸化部位を同定するため、ATM によってリン酸化されている可能性が高いアミノ酸配列 (SQ) を 5 つすべて AQ に変化した変異型 *SOG1(AQ)-Myc* コンストラクトを持った植物体を構築した。この植物体を用いて、DNA ダメージに依存した SOG1 の高リン酸化を調べたところ、変異型 SOG1(AQ) では DNA ダメージに依存した高リン酸化のバンドは消失していた (図 4 バンド c)。この結果から、SOG1 は DNA ダメージが生じると、SQ 配列が一つあるいは複数リン酸化されていることが明らかになった。

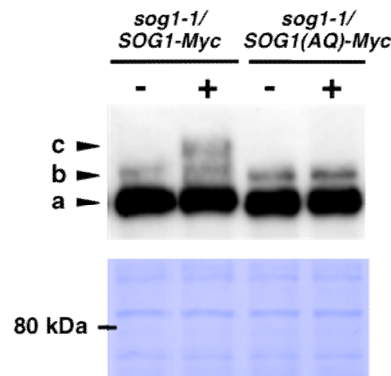


図4: SOG1リン酸化サイトの同定  
 5. a: SOG1-Myc, b: リン酸化された SOG1-Myc, c: 高リン酸化された SOG1-Myc

### ④ SOG1 リン酸化の意義の解明

SOG1 の SQ モチーフをすべて AQ に変化させ、リン酸化を受けなくなった変異型 SOG1(AQ)-Myc コンストラクトと野生型 SOG1-Myc コンストラクトをもった植物体において、DNA ダメージに依存した転写誘

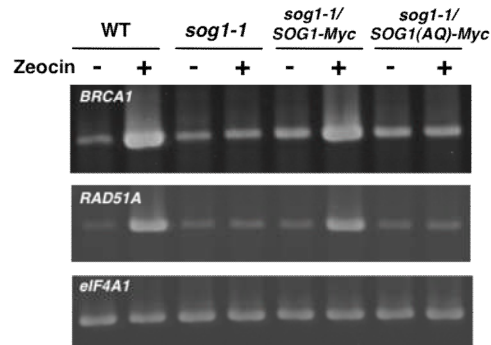


図5: SOG1リン酸化が、DNAダメージに依存した転写レスポンスに及ぼす影響  
*BRCA1* と *RAD51A* は DNA ダメージが生じると転写が誘導される遺伝子であり、その転写誘導には SOG1 のリン酸化が必要である。*eIF4A1* はコントロール

導について調べた。その結果、変異型 SOG1(AQ) コンストラクトをもった植物体で

は、遺伝子の転写誘導が生じなくなっていた (図 5)。さらに DNA ダメージに応答した細胞周期の停止やプログラム細胞死も変異型 SOG1 を持った植物体では生じなくなったことから (図 6)、ATM による SOG1 の SQ モチーフの高リン酸化は、DNA チェックポイントにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになった。以上の結果から、植物の SOG1 は、動物の p53 とは全く異なるタンパク質であるにもかかわらず、その制御機構は植物と動物で類似していることが明らかになり、この発見は DNA チェックポイントを進化の観点から考える上でも大変興味深い。

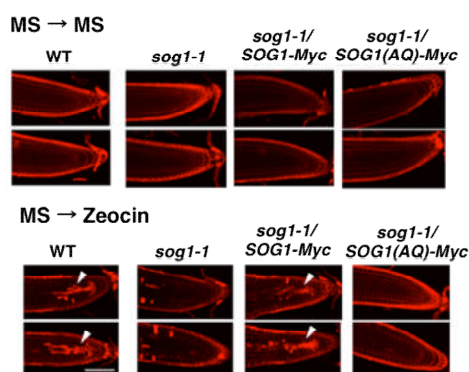


図6: SOG1リン酸化がDNAダメージに依存したプログラム細胞死に及ぼす影響

## (2) SOG1 タンパク質と相互作用する因子の単離

SOG1-Myc コンストラクトが導入された植物体を用いて、DNA ダメージ誘導剤であるゼオシン処理した植物体と、処理していない植物体からタンパク質を抽出し、Myc 抗体で共免疫沈降 (Co-IP) したサンプルを質量分析計によって解析した。その結果、DNA ダメージに依存して SOG1 と相互作用する因子の候補が約 90 サンプル同定できた。その中にはリン酸化酵素、翻訳開始因子、機能未知のタンパク質などが含まれていた。今後はもう一度同様の実験を行い、再現性を確認した後、興味深い因子に焦点をおいて、それらの因子が植物体内で相互作用するかどうかを Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)法などで確認する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 愿山 (岡本) 郁, 木村成介, 真木寿治, 梅田正明  
植物が独自に獲得した DNA 損傷応答のマスターレギュレーター-SOG1 の制御メカニズム  
植物生理学会第 54 回大会, 2013.3.21, 岡山県 岡山市
- (2) 愿山 (岡本) 郁, 真木寿治, 梅田正明, 植物 DNA 損傷チェックポイント因子 SOG1 は動物ガン抑制遺伝子 p53 のカウンターパートか?  
日本遺伝学会第 84 回大会, 2012.9. 24, 福岡県 博多市

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

愿山 郁 (YOSHIYAMA KAORU)  
京都産業大学・総合生命科学部・特定研究員 (PD)  
研究者番号: 10346322