

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440147

研究課題名(和文) 損傷乗り越え複製と植物のゲノム安定性の研究

研究課題名(英文) Roles of translesion synthesis in plant genome stability

研究代表者

坂本 綾子 (Sakamoto, Ayako)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：00354960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物がゲノムの安定性を脅かす様々なDNA損傷ストレスに対してどのように対処しているかを明らかにする目的で、損傷したDNAの複製に関わるDNAポリメラーゼとDNA複製装置との関係や、損傷乗り越え複製機構の制御メカニズムについて解析した。その結果、異なる損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼ間やDNAポリメラーゼとDNA複製クランプとの間でタンパク質間相互作用がみられることが明らかになった。また、損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼを欠損させると相同組換えの経路が優先的に使用されることや、二つの経路の制御に熱ショックタンパク質が関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the molecular mechanism by which plants cope with DNA-damaging stresses that endanger the genome stability, we have analyzed the DNA polymerases that specifically replicate damaged DNA. We found that translesion synthesis (TLS)-type DNA polymerases interact each other and also with DNA replication clamp. We also found that the frequency of homologous recombination was significantly increased by ultraviolet light irradiation when either AtRev1 or AtPol were disrupted. Furthermore, both mutation and recombination frequencies were affected when plants were grown in the presence of a heat shock protein (HSP) inhibitor, suggesting HSPs are involved in two pathways.

研究分野：生物学

キーワード：損傷乗り越え複製 環境応答 ゲノム安定性 相同組換え 熱ショック蛋白質

1. 研究開始当初の背景

植物のゲノムは環境からもたらされる紫外線や化学物質などの外的要因や、細胞内代謝の過程で生じる活性酸素など内的要因により常に損傷を受け続けている。これらの損傷はDNA複製を阻害して細胞分裂や生長・分化を抑制するだけでなく、DNA配列の変化を誘発しゲノムの安定性を脅かす。このような事態を回避するため、植物はDNA損傷時や複製阻害時に細胞周期を一時的に停止するチェックポイント機構を持つことが知られている。

チェックポイント反応をすり抜けて損傷が修復されずに残った場合には、複製後修復または相同組換え (homologous recombination; HR) の系を利用して複製の続行が図られる。複製後修復には、DNAの損傷部位を乗り越えて複製を継続させる損傷乗り越え複製 (translesion synthesis; TLS) と、損傷の無い娘鎖とを鋳型として複製を行う template switching の経路がある。損傷乗り越え複製は鋳型としての機能を失ったDNAを複製するため、複製エラーによって突然変異を誘発しやすい。

動物や酵母では損傷乗り越え複製 (TLS) と template switching の使い分けについての研究が進んでおり、例えば複製阻害時には proliferating cell nuclear antigen (PCNA) のモノユビキチン化が起こり、それによって複製型ポリメラーゼから損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼへの置換がなされる一方で、PCNAがポリユビキチン化されると娘鎖同士が交換して損傷のない鋳型を用いる template switching が起こる。しかし植物でどのようにこれら三つの経路が使い分けられているのかは全く解析されていない。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでにシロイヌナズナの損傷乗り越え型DNAポリメラーゼである AtPol ζ 、AtRev1、AtPol η の同定に成功し、損傷乗り越え複製によって植物が紫外線や放射線に対する耐性を獲得する一方で、突然変異頻度の上昇をもたらす、細胞死やゲノム不安定化の原因となることを明らかにしてきた。

本研究では、これらの損傷乗り越え型DNAポリメラーゼがどのように使い分けられ、制御されているのかを明らかにすることを通じ、高等植物のゲノムの安定性・健全性を維持機構の全体像を解明することを目的とする。

具体的には、1) 損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ (AtPol ζ 、AtRev1、AtPol η) が相同組換え活性に及ぼす作用の解析、2) 損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼとDNA複製装置との相互作用、3) 損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼと熱ショック蛋白質 (HSP) との相互作用等について生化学的・分子遺伝学的手法で解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ欠損株へのマーカー遺伝子の導入と相同組換え活性の解析

損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ欠損株 (*rev3-1*、*rev1-4*、*polh-1*) と相同組換え検出マーカー系統 (1406、1415、IC-9) とを交配し、得られたF2植物からPCRによって野生型およびポリメラーゼ欠損系統を選抜する。このF2植物から自殖種子を調製してハイグロマイシン培地上に播種し、マーカーがホモで挿入されている系統を選抜する。

野生型およびポリメラーゼ欠損バックグラウンドの試験系統を同時に育成し、GUS染色後に実体顕微鏡下でGUS+の組織セクターを検出する。1個体当たりの青色セクターの数をカウントすることにより、組換え頻度を数値化する。

(2) 損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼとPCNAの相互作用の解析

損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼ (AtPol ζ 、AtRev1、AtPol η) の全長または特定のドメインとAtPCNA2を酵母 two-hybrid 実験用ベクターに組み込み、選択培地上での生育の有無を指標に蛋白質間相互作用を解析する。

(3) HSP阻害による突然変異および相同組換え頻度への影響の解析

突然変異検出マーカー (*Uida112G-T*、*Uida166G-T*) 導入系統および相同組換え検出マーカー系統 (1406、1415、IC-9) をHSP阻害剤または mock 試薬を添加した培地上で生育し、組織をGUS染色することにより突然変異および組換え頻度を数値化する。また、上記の方法で育てた植物に紫外線やガンマ線を照射し、突然変異や相同組換え頻度の上昇に差があるかどうかを解析する。

さらに、上記の相同組換えマーカー系統をHSP90に対するRNAiコンストラクトを有する系統と交配し、HSP90の発現量を抑えた時に相同組換え頻度にどのような影響が見られるかを解析する。

4. 研究成果

(1) 損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼ欠損による相同組換え活性の上昇

相同組換えマーカーを導入した損傷乗り越え複製型DNAポリメラーゼ欠損株 (*rev3-1*、*rev1-4*) と野生株を育成し、GUS染色により組換え頻度の検出を行った。その結果、AtPol ζ 欠損株 (*rev3-1*) では野生株と同等かやや高い相同組換え頻度を示すことがわかった。またAtRev1欠損株 (*rev1-4*) は1406系統で相同組換え頻度の上昇が見られた (図1)。一方、1415およびIC-9マーカーについては*rev1-4*株に導入することが出来なかった。この原因としては、マーカーの挿入部位が*rev1-4*系統における染色体再編成部位に近

いために、減数分裂時の組換えが生じにくいことが考えられた。

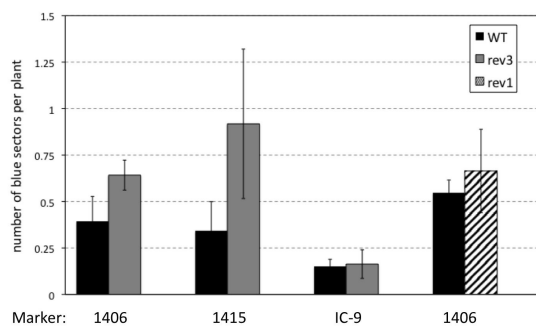


図1 損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼの欠損が相同組換え頻度に及ぼす効果

(2) AtPol ζ 、AtRev1 欠損株に対する紫外線 (UVC) 照射効果の解析

損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼ欠損株 (*rev3-1*、*rev1-4*) とコントロールとなる野生株を育成し、紫外線処理を行った後に組換え頻度の検出を行った。その結果、AtPol ζ 、AtRev1 欠損株ではコントロールに比べて著しい組換え頻度の上昇が観察された (図 2)。

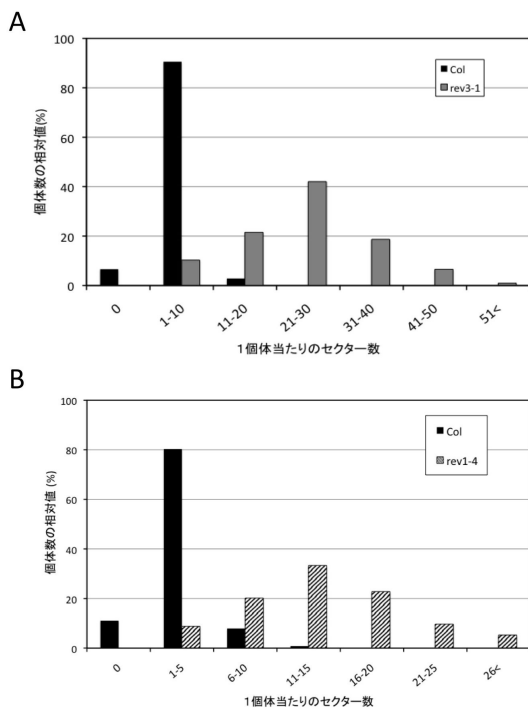


図2 損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼ欠損株における紫外線照射後の組換え頻度

一方で、野生株と AtRev1 欠損株 (*rev1-4*) にガンマ線を照射した場合、*rev1-4* 株での相同組換え活性は、コントロールとほぼ同じであった。このことから、ガンマ線を照射処理による相同組換え活性の上昇は、少なくとも AtRev1 に非依存的に起こることが明らかに

なった。

(3) 損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼ、PCNA の相互作用の解析

損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼ (AtPol ζ 、AtRev1、AtPol η) の全長または特定のドメイン、および PCNA2 を酵母 two-hybrid 実験用ベクターに組み込み、選抜培地上での生育の有無を指標に蛋白質間相互作用を解析した。その結果、AtRev1 と AtPol η との間、AtRev1 と AtPol ζ の調節ドメインである REV7 との間で、相互作用が観察された (図 3 A)。一方、PCNA2 と AtRev1 との間でも相互作用が観察されたが、従来の報告と異なり、PCNA2 と AtPol η との相互作用についてはコントロールとほとんど差が見られなかった (図 3 B)。

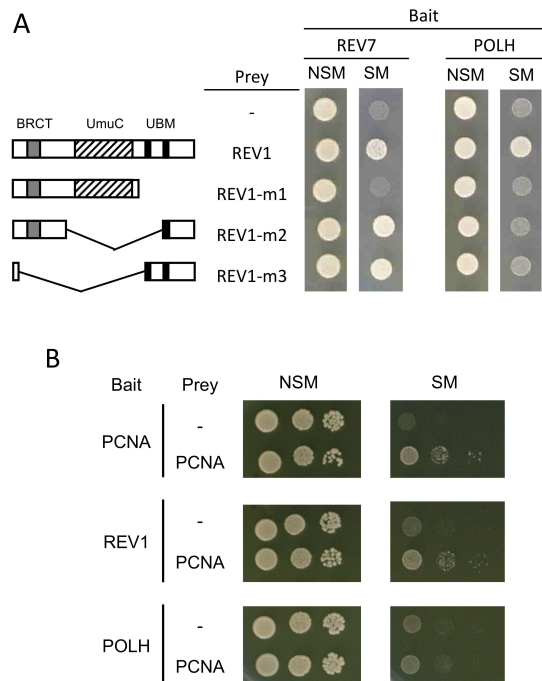


図3 酵母細胞内での損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼの相互作用

(4) HSP 阻害による突然変異および相同組換え頻度への影響の解析

相同組換え検出マーカーを導入したシロイヌナズナを HSP 阻害剤または mock 試薬を添加した培地上で生育し、組織を GUS 染色することにより組換え頻度を解析したところ、HSP 阻害剤の添加により相同組換え頻度の上昇が観察された。このことから、HSP が相同組換えを抑制する機能があることが示唆された。また野生株と損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼ欠損株 (*rev1-4*) では、ポリメラーゼ欠損と HSP の阻害が相加的に効いたことから、HSP による組換え抑制効果は AtRev1 とは独立の経路で働く可能性が示唆された。

一方、突然変異検出マーカーを導入した相同組換えマーカーを導入した損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼ欠損株 (*polh-1*) と野生株を HSP 阻害剤または mock 試薬を添加し

た培地上で生育し、12日目に紫外線照射を行った後にGUS染色して突然変異頻度の解析を行った結果、AtPol η 欠損株ではHSP阻害剤の添加により突然変異頻度の低下が観察された。このことから、HSPが誤りがち損傷乗り越え複製を促進する機能があることが示唆された(図4)。

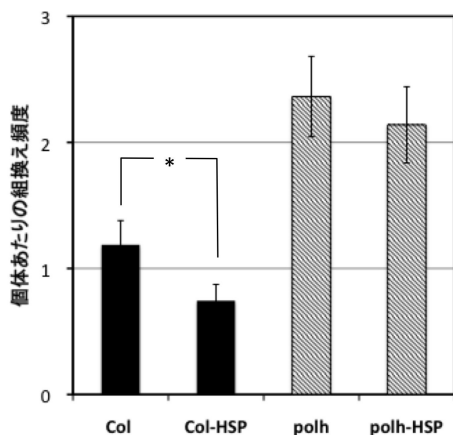


図4 HSPの阻害による突然変異頻度への影響

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)

[雑誌論文](計 1件)

Balestrazzi A, Achary VMM, Macovei A, Yoshiyama KO and Sakamoto AN. Editorial: Maintenance of Genome Integrity: DNA Damage Sensing, Signaling, Repair, and Replication in Plants, *Front. Plant Sci.* 2016. 査読あり doi: 10.3389/fpls.2016.00064

[学会発表](計 8件)

Sakamoto AN, Akita M, Yamaguchi H and Teranishi M. Deletion of TLS polymerases promotes UV- or IR-induced homologous recombination in *Arabidopsis*. July 7-10, 2016. 湘南国際村センター(神奈川県葉山町)

秋田 睦、横田 裕一郎、坂本 綾子「イオンビームによるマイトマイシン C 感受性シロイヌナズナ変異体の単離と変異原因遺伝子の探索」第10回高崎量子応用研究シンポジウム 2015年10月8日 高崎量子応用研究所(群馬県高崎市)

Teranishi M, Yamaguchi H, Sakamoto AN, Hidema J. Analysis of DNA damages induced by ion beam, gamma ray and UV-B radiation in *Arabidopsis*. 15th International Conference of Radiation Research, May 25-29, 2015. 国立京都国際会館(京都府京都市)

Sakamoto AN, Vo TTN, Akita M and Hase Y. An ion-beam induced balancer chromosome in *Arabidopsis*. 第56回日本植物生理学会年会 2015年03月16~17日 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

Sakamoto AN, Nemoto K, Seki M, Shinozaki K and Sawasaki T. *in vitro* Screening of Target Kinases of AtATR. Plant Genome Stability and Change 2014, July 17-20, 2014. Pacific Grove (CA, USA)

玉置 雅紀、坂本 綾子、遠藤 真咲、土岐 精一「放射性物質汚染土壌で栽培した植物における遺伝子組換え頻度の検証」第55回日本植物生理学会年会、2014年3月19~20日、富山大学五福キャンパス(富山県富山市)

坂本 綾子、秋田 睦、遠藤 真咲、土岐 精一「高等植物における損傷乗り越え複製と突然変異」日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月18日、ホテルクラウンパレス青森(青森県青森市)

坂本 綾子、土岐 精一、日出間 純「イオンビームおよびガンマ線の植物の相同組換え活性に及ぼす効果」第8回高崎量子応用シンポジウム、2013年10月11日、高崎シティーギャラリー(群馬県高崎市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 綾子(SAKAMOTO N. AYAKO)
国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究主幹
研究者番号: 00354960