

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06060・19K21185

研究課題名(和文) イネSog1の機能解析とその発現調節による高効率ジーンターゲット系の確立

研究課題名(英文) Functional analysis of rice Sog1 in DNA damage response

研究代表者

横井 彩子 (Nishizawa-Yokoi, Ayako)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：10760019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：イネSog1およびSog1-likeのDNA損傷応答における役割を明らかにするため、ジーンターゲットによりこれら遺伝子のノックアウト系統およびイネSog1のリン酸化サイトの置換による不活性型変異体を作成した。これら変異体を用いて、DNA損傷感受性とmicroarray解析を行ったところ、イネSog1はシロイヌナズナSog1と同様にDNA損傷応答を制御しており、その制御にはリン酸化が必要であることが明らかとなった。また、Sog1-likeはSog1の下流において、Sog1標的遺伝子の一部を制御する役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基礎研究だけでなく作物育種などにおいても必須な技術となりつつあるゲノム編集は、様々な作物種へ適用可能な技術へ発展させるために効率の向上が課題である。ゲノム編集技術の効率の向上にはDNA修復経路の制御機構を解明することが重要であり、本課題において重要作物であるイネにおいてDNA修復の制御因子としてのSog1の機能を明らかにできたことは、基礎的な知見を得るとともに、汎用的ゲノム編集技術の確立にも応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the function of rice Sog1 (OsSog1) and Sog1-like (OsSog1-like) in the DNA damage response, we generated OsSog1 or OsSog1-like knock-in null mutants (sog1 KO or sog1-like KO) carrying reporter gene and OsSog1 functionally inactive mutant (sog1 AQ mutant) in which dephospho-mimic substitutions were introduced into phosphorylation sites of endogenous OsSog1 gene by gene targeting. The sensitivity test of OsSog1 and OsSog1-like mutant plants to DNA damage agent revealed that OsSog1, not OsSog1-like, plays an important role in the induction of the DNA repair process in rice. Microarray analysis with wild-type, sog1 KO, sog1-like KO and sog1 AQ mutants treated with DNA damage agents showed that OsSog1 regulated the expression of genes involved in the oxidative stress defense, DNA repair and the regulation of gene expression through the activation by phosphorylation. OsSog1-like regulated a part of OsSog1-regulated genes under the control of OsSog1.

研究分野：植物におけるDNA修復機構の解明およびゲノム技術の開発

キーワード：DNA double strand breaks Sog1 DNA repair rice

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術は、標的遺伝子とその遺伝子座において直接改変できる技術であり、基礎研究のみならず作物育種などの応用研究においても必須の技術になりつつある。その中でも標的組換え(ジーンターゲットティング, GT)は、DNA二重鎖切断(DSBs)修復経路の一つである相同組換え(HR)を介して標的遺伝子を望み通りに改変できる技術であり、機能獲得型変異体の作出には必要不可欠である。我々はこれまでに、イネにおいて再現性の高いGT技術を確立することに成功しており(Nishizawa-Yokoi et al., Plant J., 2015)、さらにGT効率を向上させる研究に取り組んできた。高等植物のDSBs修復経路には主に2つの経路が存在しており、一つはDNA末端を再結合する非同相末端結合(NHEJ)経路で、もう一つはGTに關与するHR経路である。高等植物では、NHEJがHRより優勢に機能しており、生じたDSBsのほとんどがNHEJ経路で修復されてしまうことから、HRを利用するGTが生じる頻度は非常に低いと考えられている。動物細胞を用いた研究で、NHEJ経路はHR経路と拮抗して機能していることが明らかとなっていることから、これまでに我々は、NHEJ関連因子のノックダウンあるいはノックアウトによりHR活性を向上させる試みを行っており、実際にイネにおいてNHEJ経路の抑制はHR活性を向上させることが明らかとなった(Nishizawa-Yokoi et al., New Phytol., 2012)。しかしながらNHEJ経路の抑制は、その細胞毒性からイネカルス増殖阻害が認められたため、実用化研究には不向きであると考えた。

そこで、シロイヌナズナにおいてDNA修復経路のマスターレギュレーターとして知られるSUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1(SOG1)に注目した。シロイヌナズナSog1は、HR関連因子の発現を制御していることが知られていることから(総説: Okamoto-Yoshiyama, Genes Genet. Syst., 2015) SOG1の発現を調節することでDNA修復経路の選択性を変化させることができるのではないかと考えた。しかしながら、GT系が確立されているイネにおいて、SOG1遺伝子の機能はほとんど明らかにされていなかったため、本課題においてイネSog1遺伝子の機能解析を行った。

2. 研究の目的

GTは、DNA修復経路の一つである相同組換えを利用して外来DNAとして細胞内に導入した鋳型の配列を内在性の標的遺伝子上にコピー/ペーストして改変する技術であり、標的遺伝子を望み通りに改変できるゲノム編集技術の一つとして近年注目されている技術である。しかしながら、形質転換効率の高いイネカルスに効率の良い選抜系を適用してもなお、GT効率は低いのが問題点である。さらに、イネ以外の高等植物では、モデル植物においてさえ、再現性の高いGT系が確立されていないのが現状である。これらの問題点を解決するには、GT効率そのものを向上させることが重要である。そこで、DNA修復経路の調節がGT効率を向上させるのに有効であると考えた。

シロイヌナズナでは、DNA修復経路に関わる多くの遺伝子が同定されており、その機能解析が進んでいる(総説: Nikitaki et al., Mutat. Res., 2018)。その中で、Sog1というNAC転写因子の一つが、シロイヌナズナではDNA修復経路のマスターレギュレーターとして機能していることが知られており、DNA損傷が生じるとATMやATRといったキナーゼがシグナルを受けてSog1をリン酸化して活性化し、HR関連因子などのDNA修復に関わる因子の発現を誘導することが明らかとなっている(総説: Okamoto-Yoshiyama, 2015, Genes Genet. Syst.)。このことから、Sog1の発現制御機構を介してHRを活性化することができるのではないかと考えた。しかしながら、GT系が確立されているイネにおいて、Sog1遺伝子の機能はほとんど明らかにされていない。本研究において、これまでほとんど解析が進んでいなかったOsSog1およびOsSog1-likeを中心としたイネにおけるDNA損傷応答のメカニズムを解明し、Sog1の発現調節によりイネにおける高効率GT系の確立を試みる。この成果を他の植物に適用することにより、様々な植物種で利用可能な汎用的GTの確立が期待される。

3. 研究の方法

BLAST検索により、シロイヌナズナSog1(AtSog1)に相同性のあるイネオーソログは2遺伝子存在することが明らかとなった。このうち、AtSog1のDNA損傷による活性化に関わるATMによるリン酸化サイトを全て保存している遺伝子をOsSog1、部分的に保存している遺伝子をOsSog1-like遺伝子とした。GTにより内在性OsSog1およびOsSog1-like遺伝子のプロモーター下流にGUS遺伝子をノックインすることでそれらの遺伝子の機能を欠損させた変異体系統を作出した(sog1 KOおよびsog1-like KO)。またシロイヌナズナsog1は、ATMによるリン酸化で活性化することが知られていることから、内在性OsSog1遺伝子のATMリン酸化サイトのアミノ酸を置換した不活性型変異体(sog1 AQ)系統もGTにより作出した。さらに、これらは機能相補している可能性が考えられるため、OsSog1およびOsSog1-likeのキメラリプレッサー型過剰発現系統(sog1 CRES-Tおよびsog1-like CRES-T)を入手するとともに、CRISPR/Cas9によりOsSog1およびOsSog1-like両遺伝子をノックアウトした二重変異体系統(sog1sog1like)を作出した。これらの変異体系統のT2世代を得て、以下の解析を行った。

(1) DNA損傷に対する感受性試験

OsSog1およびOsSOG1-likeがイネにおけるDNA損傷応答およびDNA修復経路に關与してい

るかどうかを明らかにすることを目的として、野生株（日本晴）*sog1* KO、*sog1*-like KO、*sog1* AQ、*sog1*CRES-T、*sog1*-like CRES-T、*sog1sog1like* の滅菌種子を DSBs を生じさせる薬剤プレオマイシンを種々の濃度（0、1、2.5、5、10 μ M）で含む培地上に播種し、6 日間栽培した後、根の長さを測定することで感受性を調べた。

（2）DNA 損傷条件下における microarray 解析

OsSog1 および OsSOG1-like を介した DNA 損傷応答および DNA 修復機構を解明するため、野生株（日本晴）*sog1* KO、*sog1*-like KO、*sog1* AQ、*sog1sog1like* の 1 週齢の幼苗を 10 μ M のプレオマイシンで処理し、根から抽出した Total RNA を用いて microarray 解析を行った。

4. 研究成果

（1）DNA 損傷に対する感受性試験

GT により作出した *sog1* KO および *sog1*-like KO、Sog1 AQ 変異体において、Sog1 および Sog1-like 遺伝子の通常条件下における発現量を RT-PCR により解析した（図 1）。その結果、*sog1* KO および *sog1*-like 変異体において Sog1 および Sog1-like 遺伝子の転写産物は全く認められなかった。一方、Sog1 AQ 変異体における Sog1 遺伝子の転写レベルは、野生株と違いは認められなかった。しかし、その転写産物の配列を解析したところ、GT により導入したリン酸化部位のアミノ酸置換が導入されていることを確認した。また、*sog1* KO および *sog1* AQ 変異体において、*sog1*-like 遺伝子の転写産物の減少が認められたことから、Sog1-like が Sog1 に発現制御を受けている可能性が考えられた。

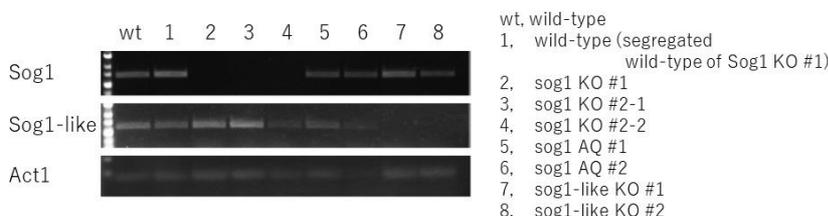


図1 Sog1およびSog1-like変異体におけるSog1およびSog1-like遺伝子の転写レベル
sog1 KO (sample no. 2-4), *sog1* AQ (no. 5, 6), *sog1*-like KO (no. 7, 8) におけるSog1 (上段) および Sog1-like (中段) をRT-PCRによって解析した。内部標準としてOsActin 1 (Act1, 下段) の転写量も示す。

次に、DNA 損傷を誘導するプレオマイシンを含む培地上で野生株および種々の変異体を生育させ、DNA 損傷に対する感受性を解析した。その結果、高濃度のプレオマイシンを含む培地上で *sog1* KO、*sog1* CRES-T、*sog1*-like CRES-T、*sog1sog1like* 変異体の根の伸長が野生株に比べて阻害された。しかしながら、*sog1*-like KO 変異体の根の伸長は、いずれの濃度の培地上でも野生株と大きな違いは認められなかった。これらの結果から、OsSog1 はイネの DNA 損傷応答および DNA 修復経路に関与しているが、OsSog1-like は関与していない可能性が示された。また、*sog1* AQ 変異体は、野生株に比べて感受性を示したが、完全に機能を欠損した変異体に比べて弱い感受性を示した。この結果から、Sog1 を介した DNA 損傷応答および DNA 修復経路には、リン酸化を介した経路の他にもシグナル伝達経路を介していることが示唆された。

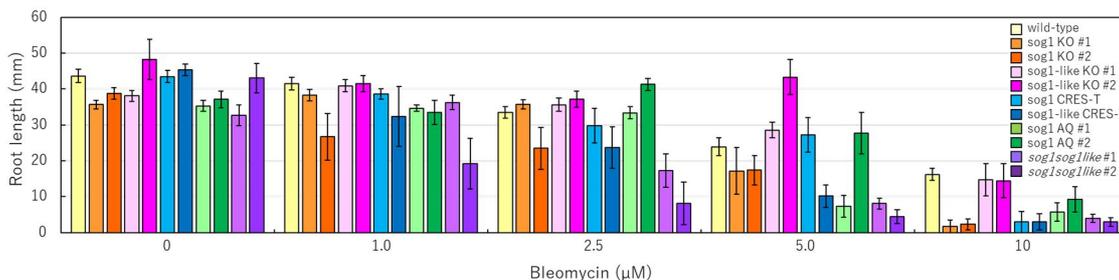


図2 野生株および種々の*sog1*、*sog1*-like変異体のDNA損傷感受性
 各系統の種子を種々の濃度（0、1、2.5、5、10 μ M）のプレオマイシンを含む培地に播種し、6日後の根の長さを測定した。

（2）DNA 損傷条件下における microarray 解析

OsSog1 および OsSOG1-like を介したイネにおける DNA 損傷応答および DNA 修復機構を解明するため、野生株（日本晴）*sog1* KO、*sog1*-like KO、*sog1* AQ、*sog1sog1like* の 1 週齢の幼苗を 10 μ M のプレオマイシンで処理し、microarray 解析を行った。その結果、300 を超える遺伝子がプレオマイシン処理条件下の野生株において 5 倍以上発現変動しており（発現誘導：211 遺伝子、発現抑制：98 遺伝子）、それらの 98% の遺伝子が P*sog1*-GUS、*sog1* 7A および *sog1sog1like* 変異体においてその発現変動が抑制されていた（図 3）。これらの遺伝子群の中には、酸化的ストレス防御に関する遺伝子や DNA 修復に関わる遺伝子、転写制御に関わる遺伝子などが含まれていた。DNA 修復に関わる遺伝子群の中には、相同組換えに関わる遺伝子の他にも、Mismatch excision repair や DNA-crosslink repair など、複数の経路に関与する遺伝子が Sog1 の標的遺伝子であることが示唆された。

また、Sog1-like 遺伝子もこれらの遺伝子群の中に含まれており、Sog1 遺伝子の標的遺伝子であることが示された。一方、Sog1-like 変異体ではこれらの遺伝子の多く（発現誘導：9割、発現抑制：6割）の発現変動が野生株と変わらず、Sog1 標的遺伝子群中でも Sog1-like を介して発現制御されているものは少ないと考えられた。

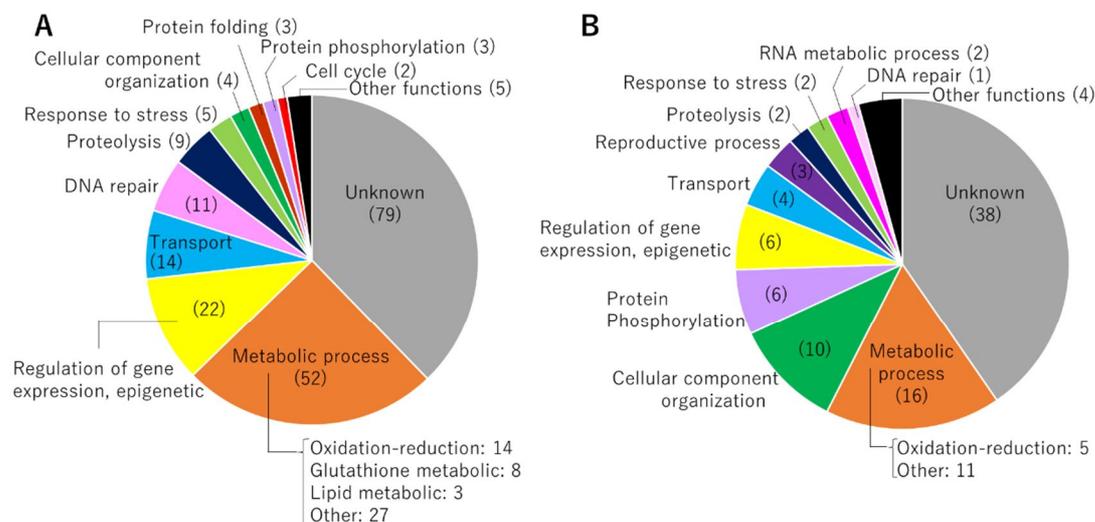


図3 Microarray解析によって同定したSog1の標的遺伝子

A, 野生株において5倍以上発現が増加し、Sog1変異体においてその発現増加が抑制されていた遺伝子群の予測機能(209遺伝子)。B,野生株において5倍以上発現が減少し、Sog1変異体においてその発現減少が抑制されていた遺伝子群の予測機能(94遺伝子)。

以上の結果から、イネ Sog1 遺伝子が複数の DNA 修復経路に関与することが明らかとなった。そこで、これまでに作出した Sog1 過剰発現やノックアウト変異体において、人工制限酵素による標的切断の効率や導入される変異パターンが変化するかどうか、また、相同組換え活性や標的組換え効率に影響を及ぼすかどうかを今後検討したい。また現在、標的組換えによりイネ Sog1 遺伝子のリン酸化サイトを全て疑似リン酸化した恒常的活性型変異体を作成しており、これら変異体においても標的変異効率や、相同組換え活性、標的組換え効率に及ぼす影響を解析する。

< 引用文献 >

- Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Ohtsuki N, Saika H, Toki S. (2015) Precision genome editing in plants via gene targeting and *piggyBac*-mediated marker excision. *Plant J.* 81: 160-168.
- Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Saika H, Kwon YI, Osakabe K, Toki S. (2012) Suppression of Ku70/80 or Lig4 leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice. *New Phytol.* 196: 1048-1059.
- Nikitaki Z, Hol M, Don M, Pavlopoulou A, Michalopoulos I, Angelis KJ, Georgakilas AG, Macovei A, Balestrazzi A. (2018) Integrating plant and animal biology for the search of novel DNA damage biomarkers. *Mutat Res.* 775: 21-38. Review.
- Yoshiyama KO. (2016) SOG1: a master regulator of the DNA damage response in plants. *Genes Genet Syst.* 90: 209-216. Review.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----