

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07455

研究課題名(和文) SOG1転写因子を介したDNA損傷応答の選択的・時間的・空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Selective-, Temporal-, and Spatial-control of DNA damage responses mediated by SOG1 transcription factor

研究代表者

愿山 郁 (Yoshiyama, Kaoru)

東北大学・生命科学研究科・学術研究員

研究者番号：10346322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのゲノムDNAが損傷を受けた際、転写因子SOG1はリン酸化されることで活性化し、下流の1000以上の遺伝子の転写を変化させ様々な応答反応を誘導する。本研究ではSOG1の5箇所のリン酸化部位に変異を導入し、そのリン酸化の意義についての検討を行った。その結果、SOG1の5箇所のリン酸化部位は独立にリン酸化されるのではなく順番があること、さらにリン酸化の数が多くなるほど、DNA合成、細胞死、細胞分化といったDNA損傷応答の活性化が強くなることを明らかにした。さらにSOG1を過剰発現すると、DNA損傷応答は野生型よりも強くなり、また同時に病原菌に対する免疫応答も強くなることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は動くことが出来ないため、DNA損傷を受ける環境に適応して生きなければならず、動物とは異なるDNA損傷応答の仕組みを持っていることが予想される。本研究では、植物だけが持つSOG1転写因子(DNA損傷応答の活性化に関与)に注目し、SOG1のリン酸化数が増えるにつれ、DNA損傷応答が徐々に強くなること、さらにはSOG1を過剰発現させると、DNA損傷応答だけでなく、病原菌への免疫応答も強くなることを示した。これらの結果から、SOG1を改変することで、植物のDNA損傷応答や免疫応答を増強できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：A. thaliana SOG1 transcription factor is phosphorylated in response to DNA damage and regulates thousands of downstream genes. As a result, various responses are activated, and plants can maintain genome stability. In this study, we introduced mutations into five phosphorylation sites of SOG1 to understand the meaning of the phosphorylation. We found that five phosphorylation sites are not phosphorylated independently but phosphorylated in order. Furthermore, as the number of phosphorylation sites increased, inhibition of DNA synthesis, programmed cell death, and cell differentiation were incrementally induced. We also observed that SOG1 overexpression increases not only the DNA damage responses but also immune response.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物 DNA損傷応答 DNA修復 プログラム細胞死 転写因子 リン酸化 免疫応答 チェックポイント

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命の設計図であるゲノムDNAを安定に保つことは、その個体の維持や子孫に遺伝情報を正確に伝達するために必須である。しかし、太陽からの紫外線や自然放射線、また生体内の代謝の過程で生じる活性酸素などによって生物のゲノムは常に傷つけられている。そこで細胞はDNAが損傷を受けた事を認識し、様々な応答反応を誘導する事でゲノムを安定に維持するためのDNA損傷応答機構を保持している。植物は固着性であるため、ゲノムDNAに損傷を与える様々な環境変化（自然放射線、紫外線、強光、乾燥、化学物質による土壌汚染など）に適応して生きていかなければならない。よって、植物は効率の良い独自のDNA損傷応答機構を保持していると考えられる。

申請者はこれまでに、植物だけに存在するDNA損傷応答因子であるシロイヌナズナのSOG1転写因子を発見した(図1)。SOG1は、放射線照射に応答して1000種類以上の遺伝子の転写を制御しており、「細胞周期の停止」「DNA修復の活性化」「細胞分化の誘導」「プログラム細胞死」といった多彩な応答反応の制御を司っているマスターレギュレーターである(図2)。



図1 SOG1の構造

C末端に5ヶ所のSQアミノ酸モチーフが存在する

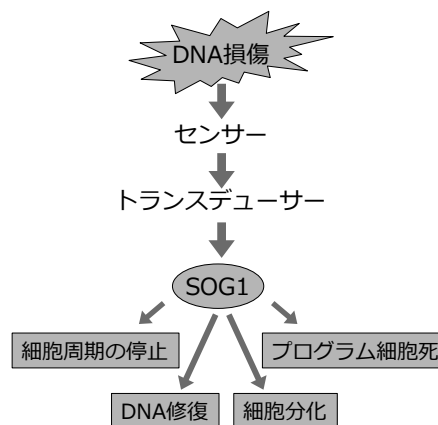


図2 DNA損傷応答のモデル図(シロイヌナズナ)

2. 研究の目的

これまでの申請者等の研究結果から、SOG1はDNA損傷に応答して、細胞周期の停止、DNA修復、細胞分化、プログラム細胞死といった生理作用の異なる様々な経路の活性化に必要である事が示された(図2)。しかし「DNA修復」は細胞を生かす応答であり、「細胞死」は細胞を排除する応答である。このように正反対の応答反応をSOG1がどのような状況によって使い分けているのかという問題は大変重要であるが、全く明らかになっていない。活性化する応答反応は、DNA損傷の種類や程度によって変わるのか、また応答反応はDNA損傷を受けてから、時間経過とともに変化するのか、さらに応答反応は、DNA損傷を受けた組織によって異なるのか、そして多彩な応答反応を、たった1つのSOG1タンパク質がどのように適切に制御しているのか、これらの疑問に対する答えもまだ無い。そこで本研究の目的は、SOG1を介したDNA損傷応答が選択的・時間的・空間的にどのように制御されているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

まずは、SOG1を介したDNA損傷応答の活性化がどの程度の速さで生じるのかを調べるため、DNA損傷(ゼオシン処理によってDNA二重鎖切断を誘導)を与えてからのSOG1のリン酸化と下流遺伝子の転写の活性化までの時間について調べた。また、活性酸素によるDNAの酸化損傷に対してもSOG1が関与しているかどうかを調べるため、*sog1*変異体に活性酸素誘発剤を処理し、その表現系を野生型と比較した。またSOG1のリン酸化とDNA損傷応答の関係性を明らかにするため、SOG1のリン酸化部位である5つのセリン-グルタミン(SQ)の数を1~5個に変化させたリン酸化変異体(1SQ~5SQ)コンストラクトを作製し、*sog1*変異体に導入したトランスジェニックラインを構築した。それらのリン酸化変異体を用いて、様々なDNA損傷応答の活性化に与える影響について検討した。また実験途中でSOG1の過剰発現体が野生型とは異なるDNA損傷応答を示したことから、その詳細についても検討した。

4. 研究成果

(1) DNA 損傷にตอบสนองした、SOG1 のリン酸化と下流遺伝子の活性化までの時間の検討 (時間的解析)

SOG1 タンパク質は、DNA 損傷にตอบสนองして 10~20 分後にはリン酸化されており、下流の遺伝子である BRCA1 や RAD51 の転写誘導は 20~30 分後には生じていた。この結果は、DNA 損傷が生じると SOG1 はすぐさまリン酸化を受け活性化され、その下流にある DNA 修復因子を発動させていることが明らかになった。また処理してからの時間が経つにつれ、そのリン酸化量が増えることも明らかになった (図 3)。

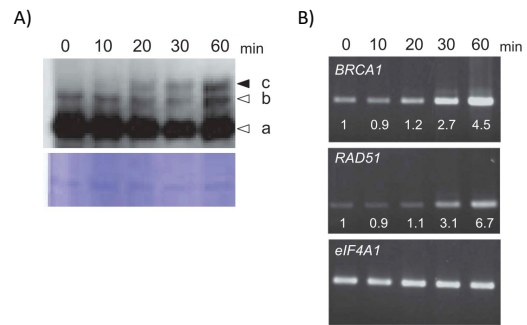


図3 SOG1タンパク質のリン酸化と下流遺伝子の活性化の経時変化
A) DNA損傷にตอบสนองしたSOG1のリン酸化の経時変化。時間はゼオシン処理してからの時間。DNA損傷にตอบสนองしてリン酸化されたSOG1は(バンドc)。B)DNA損傷にตอบสนองした下流遺伝子の転写誘導。時間はゼオシン処理してからの時間。BRCA1とRAD51はSOG1の下流遺伝子となるDNA修復因子。eIF4Aは内部標準遺伝子。バンドの下の数字は0時間を「1」とした時のバンドシグナルの強さ

(2) DNA 酸化損傷と SOG1 リン酸化の関連性 (選択性の解析)

二重鎖切断とは異なる DNA 損傷が生じた際、植物体はどのようにตอบสนองするのか、またその際にも SOG1 は関与しているかどうかを検討した。まずは、DNA に酸化損傷を与える活性酸素誘発剤を用いて根の伸長に与える影響について調べた。スーパーオキシドを生成するパラコート様々濃度で処理した場合、野生型植物の根の伸長は、パラコート濃度が高くなるにつれ徐々に抑制された。*sog1* 変異体でも野生型と同程度に根の伸長は抑制されたが、0.05 μ M のパラコートで処理した際の根の伸長抑制は野生型よりも *sog1* 変異体のほうが弱かった。この結果は、SOG1 がスーパーオキシドにตอบสนองした根の伸長停止に関与していることを示唆している。別の活性酸素生成薬剤である、過酸化水素で処理した場合においては、野生型と *sog1* 変異体の根の伸長は濃度が濃くなるにつれ抑制が強くなっていたが、野生型と *sog1* 変異体の両者に違いは認められなかった。これは同じ活性酸素でも、スーパーオキシドと過酸化水素では SOG1 の応答反応が異なることを意味している。

(3) DNA 損傷応答と SOG1 リン酸化の空間的解析

野生型のシロイヌナズナの根をゼオシン処理すると、幹細胞では細胞死が生じ、伸長領域では細胞分化が生じることが知られている。SOG1 リン酸化変異体 (1SQ~5SQ) を用いて、これらの DNA 損傷応答に影響があるかどうかを検討したところ、SOG1 のリン酸化の数が増えるにつれ、これらの応答反応が強まることが示された。さらに SOG1 リン酸化変異体における DNA 損傷にตอบสนองした転写レスポンスを RNA-seq によってゲノムワイドに調べたところ、DNA 修復系や細胞周期の抑制に関わる遺伝子群の転写は SOG1 のリン酸化数が増えるにつれ、徐々に誘導レベルが強くなっていた (図 4 A)。一方

DNA 複製や細胞周期の進行に関わる遺伝子群の転写は、SOG1 のリン酸化数が増えるにつれ、抑制レベルが徐々に強くなっていた (図 4 B)。以上の結果は、SOG1 のリン酸化数が増えるにつれ、下流の遺伝子の活性化や抑制が徐々に変化し、その結果誘導される様々な応答反応も徐々に強くなっていることを示している。

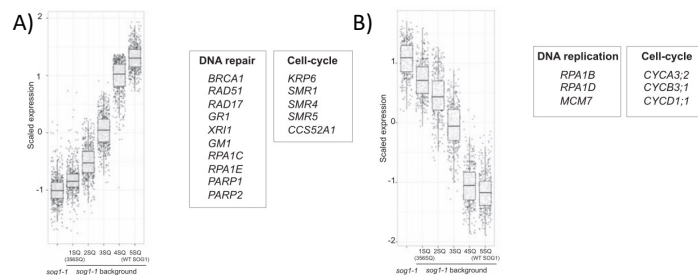


図4 SOMクラスター解析によって、SOG1リン酸化数と遺伝子群の発現パターンでの分類分け
A) SOG1のリン酸化部位が増えると、DNA損傷にตอบสนองした転写誘導が徐々に強くなる遺伝子群。
B) SOG1のリン酸化部位が増えると、DNA損傷にตอบสนองした転写抑制が徐々に強くなる遺伝子群。
右側のBOX内の遺伝子は、これらの遺伝子発現パターンを示していた遺伝子

(4) SOG1 の過剰発現が植物体に与える影響について

SOG1 は DNA 二重鎖切断 (DSBs) が生じると、細胞周期の進行を停止させる遺伝子群を発現させることで根の伸長を抑制する。SOG1 の発現量を通常の 10 倍ほど上昇させたシロイヌナズナ

(SOG1 OX) では、DSBs に応答した細胞周期の進行停止が野生型よりも強くなっており、その結果、根の伸長抑制が野生型よりも強くなっていることが明らかになった。さらに DSBs に応答して生じる根の幹細胞での細胞死や表皮細胞の分化の促進も野生型よりも亢進していた。RNA-seq 法によって、SOG1 OX が転写制御に与える影響についてゲノムワイドに調べたところ、野生型において DSBs に応答して発現が上昇することが知られている遺伝子については、野生型よりも転写量が上昇している遺伝子群と、野生型よりは抑制されている遺伝子群が存在していた。このような傾向は、DSBs に応答して発現が抑制されている遺伝子群についても見られた。SOG1 OX における、これらの転写制御の野生型との違いが上記で示した DNA 損傷応答反応の亢進といった表現系に現れていると考えられる。さらに興味深いことに、SOG1 OX ラインでは、病原菌に応答して発現が誘導される遺伝子群の転写が野生型よりも上昇していた。そこで SOG1 OX ラインの病原菌に対する感受性を調べたところ、野生型よりも耐性を示すことが明らかになった (図 5)。これらの結果は、SOG1 の過剰発現は、DNA 損傷応答を増強させるだけでなく、病原菌に対する免疫応答も活性化させることを示した。これらの病原菌に対する免疫応答は、DSBs の生成には依存していなかったため、SOG1 は DNA 損傷応答と免疫応答といった異なる経路を制御する因子であることを明らかにした。

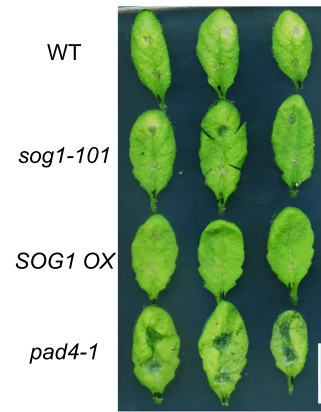


図5 SOG1の過剰発現体は病原菌耐性になる
 WT:野生株、*sog1-1*:*sog1*変異体、*SOG1 OX*:*SOG1* 過剰発現体、*pad4-1*:サリチル酸シグナ経路が働かない変異体。*SOG1 OX*では菌をスポットしたところが野生型のように白くなっていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiyama Kaoru Okamoto, Aoshima Naoki, Takahashi Naoki, Sakamoto Tomoaki, Hiruma Kei, Saijo Yusuke, Hidema Jun, Umeda Masaaki, Kimura Seisuke	4. 巻 103
2. 論文標題 SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 acts as a regulator coordinating crosstalk between DNA damage response and immune response in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-020-00994-0	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yoshiyama KO, Kimura S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Ser-Gln sites of SOG1 are rapidly hyperphosphorylated in response to DNA double-strand breaks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav	6. 最初と最後の頁 e1477904-1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yoshiyama KO, Kaminoyama K, Sakamoto T, Kimura S	4. 巻 29
2. 論文標題 Increased Phosphorylation of Ser-Gln Sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 Strengthens the DNA Damage Response in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 3255-3268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.17.00267	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ogita N, Okushima Y, Tokizawa M, Yamamoto YY, Tanaka M, Seki M, Makita Y, Matsui M, Okamoto-Yoshiyama K, Sakamoto T, Kurata T, Hiruma K, Saijo Y, Takahashi N, Umeda M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13866	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kaoru Okamoto Yoshiyama, Naoki Aoshima, Naoki Takahashi, Tomoaki Sakamoto, Masaaki Umeda, and Seisuke Kimura
2. 発表標題 Effect of SOG1 overexpression on DNA damage response in meristematic tissue
3. 学会等名 Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaoru Okamoto Yoshiyama, Atsushi Higashitani ¹ and Jun Hidema
2. 発表標題 DNA Damage Response in <i>M. polymorpha</i>
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 愿山（岡本）郁, 東谷篤志, 日出間純
2. 発表標題 植物進化に応じてDNA損傷応答機構はどのように変化したのか
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 愿山（岡本）郁, 坂本智昭, 上ノ山香織, 木村成介, 東谷篤志, 日出間純
2. 発表標題 植物DNA損傷応答のマスターレギュレーター-SOG1が果たす役割
3. 学会等名 日本遺伝学会 第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 愿山(岡本)郁、坂本智昭、上ノ山香織、木村成介
2. 発表標題 シロイヌナズナの転写因子SOG1を介したDNA損傷応答の制御機構
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2017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

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