

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570049

研究課題名（和文） 高等植物における損傷チェックポイント機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of DNA-damage checkpoint systems in higher plants

研究代表者

坂本 綾子 (SAKAMOTO N. AYAKO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号：00354960

研究成果の概要：シロイヌナズナの AtRAD26 蛋白質を解析することにより、この蛋白質が DNA 損傷を検出する AtATR キナーゼと協調的に働き、細胞周期を一時的に停止させる機能があることを明らかにした。また、AtRAD26 蛋白質のリン酸化修飾や多量体形成を検出することにより、この蛋白質がヒトの ATR 結合蛋白質や分裂酵母の Rad26 蛋白質と同様に ATR キナーゼを制御する働きがあることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物生理・分子

キーワード：環境応答 チェックポイント 細胞周期 DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

すべての生物は、DNA 複製と細胞分裂のサイクルを繰り返すことによって増殖し、生命を維持している。この細胞分裂周期の進行は様々な内的または外的な要因によって常にストレスを受けており、それによって様々な異常が生じることが知られている。細胞周期チェックポイントとは、DNA 複製作業の中断や染色体の分配異常などといった異常事態の際に、細胞周期の進行をいったん停止し、適切な処理が行われるまで次のステップに移行しないようにする機構であり、単細胞生物である酵母から哺乳動物まで広く保存されている。チェックポイント機構を欠損する

と、ヒトでは遺伝病を発症したりガンが生じることが知られており、この機構が正確な遺伝情報を維持していく上で非常に重要であることが示唆されている。

哺乳動物細胞や酵母（分裂酵母・出芽酵母）を材料とした研究により、チェックポイント機構には、DNA 複製チェックポイント、DNA 損傷チェックポイント、およびスピンドルチェックポイントなどがあり、多くの蛋白質がシグナルネットワークを形成して、それぞれの異常に対応していることが明らかにされている。例えば、DNA に損傷や複製障害が発生すると、ATM (ataxia telangiectasia mutated) や ATR (ataxia telangiectasia-

and rad3-related) などのセンサーが活性化され、メディエーター蛋白質を介して、エフェクターである Chk1 (checkpoint kinase 1) や Chk2 がリン酸化される。エフェクターの働きにより、細胞周期の調節因子である p53 や cdc25A、cdc25C などにシグナルが伝えられ、その結果、細胞周期の停止・DNA 修復・アポトーシスなどが誘導される。

高等植物においては、ATM および、ATR のホモログがシロイヌナズナから単離されている (AtATM 及び AtATR)。Britt らはさらにシロイヌナズナにガンマ線照射をおこなって、 γ -H2AX のフォーカスの形成を解析し、AtATM・AtATR の両者が損傷チェックポイントの誘導に働いていることが明らかにした。しかし、AtATM や AtATR の直接のターゲットは何であるかなど、シグナルカスケードの詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの紫外線感受性変異株のひとつである *su2* (sensitive to UV 2) 変異株は、紫外線以外の DNA 損傷処理や DNA 複製阻害剤に対しても感受性を示し、細胞周期制御に関わる因子であることが強く示唆されてきた。一方、*su2* の原因遺伝子は、646 アミノ酸からなる未知の蛋白質をコードしており、その N 末付近には GCN4 型のコイルドコイルドメインが存在した。これらのことから、*su2* の原因遺伝子は、ATR と結合し ATR の活性を制御する ATRIP (ATR interacting protein) および出芽酵母 Rad26 のホモログをコードしている可能性が強く疑われている。そこで、本研究では *su2* (*rad26* と改名) の原因遺伝子 (*AtRAD26*) と AtATR との関連性を生化学的・分子遺伝学的手法で解析し、高等植物における損傷チェックポイント機構の解明を目指す。

具体的には、1) *AtATR* 欠損株と *AtRAD26* 欠損株の表現系の比較、2) *AtRAD26* 遺伝子のチェックポイント反応に及ぼす影響、3) *AtRAD26* 蛋白質の多量体形成能の検証、4) *AtRAD26* 蛋白質の AtATR 依存的なリン酸化修飾の検証、などの解析を行い、DNA 損傷によって引き起こされるリン酸化を介したシグナルカスケードの道筋を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *AtRAD26* 欠損植物の DNA 損傷処理・複製阻害処理に対する感受性の解析

AtRAD26 遺伝子を欠損した幼植物体に対して、紫外線 B、ガンマ線、マイトマイシン C などの DNA 損傷処理やアフィディコリン、ヒドロキシウレアなどの DNA 複製阻害処理を与え、幼植物体の根の伸長を指標にこれらの処理に対する感受性を解析する。また、*AtRAD26*

欠損植物を *AtATR* 欠損植物と交配することにより、二重変異体を作製し、この植物の DNA 損傷処理・DNA 複製阻害剤に対する感受性を調べることにより、両遺伝子産物の機能の関連性を検証する。

(2) 細胞周期マーカー遺伝子を用いたチェックポイント機構の解析

細胞周期の G1/M 期のマーカーである *CycB1;1::GUS* 遺伝子を用い、*AtATR* や *AtRAD26* の欠損株で、チェックポイント反応の異常が見られるかどうかを観察する。*AtATR* や *AtRAD26* の欠損株に対して、アフィディコリンなどの DNA 複製阻害剤やガンマ線・紫外線などの DNA 損傷処理を行い、マーカー遺伝子の発現パターンを実体顕微鏡で観察することにより、*AtATR* および *AtRAD26* のチェックポイントにおける機能を解析する。

(3) 酵母 Two-Hybrid 実験系による *AtRAD26* 蛋白質の多量体形成の解析

AtRAD26 の cDNA を酵母転写因子の DNA 結合ドメインまたは転写活性化ドメインのコード領域の下流に組み込み、酵母細胞内で両遺伝子産物の間で相互作用が見られるかどうかを調べる。また、*AtRAD26* の cDNA をいくつかの領域に分割したものを同様に相互作用検出用ベクターに組み込み、多量体形成に必要なドメインを同定する。

(4) *AtRAD26* 遺伝子産物のシロイヌナズナ核抽出物によるリン酸化

AtRAD26 蛋白質が植物細胞内に存在するキナーゼによってリン酸化されるかどうかを調べるため、大腸菌中で発現させた *AtRAD26* 蛋白質と植物組織から抽出した核蛋白質画分を [γ - ^{32}P]ATP の存在下で混合し、*AtRAD26* への ^{32}P の取り込みを解析する。また、野生型植物及び *AtATR* 欠損植物から抽出した核蛋白質画分を用いた際の ^{32}P の取り込み効率を比較することにより、リン酸化活性に及ぼす *AtATR* キナーゼの寄与を検証する。さらに、*AtRAD26* のリン酸化ターゲット配列を他のアミノ酸に置換した変異蛋白質を大腸菌中で発現・精製し、これに対する ^{32}P の取り込み効率を調べることに、リン酸化のターゲットを推定する。

4. 研究成果

(1) *AtRAD26* 遺伝子の欠損株 (*rad26*) に対して、DNA 損傷処理や DNA 複製阻害処理を与え、幼植物体の根の伸長を指標にこれらの処理に対する感受性を解析した。その結果、*rad26* 変異株は、紫外線 B やガンマ線、ヒドロキシウレア、アフィディコリンに対して感受性を示し、損傷チェックポイントにかかわる *AtATR* 遺伝子の欠損株 (*atr*) で報告され

ていた結果と同様の結果を示した。また、*rad26* と *atr* の 2 重突然変異株 *atr rad26* を作製し、DNA 損傷や細胞周期阻害剤に対する反応を解析した結果、*rad26*、*atr* および *atr rad26* 変異株のヒドロキシウレアに対する感受性は全く同一であった (図 1)。このことから、*AtRAD26* と *AtATR* との強い関連が示唆された。

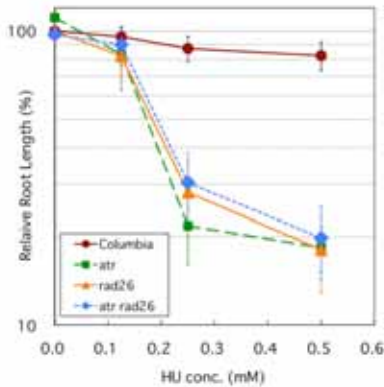


図 1 根の伸長に及ぼすヒドロキシウレア(HU)の効果

(2) 細胞周期の G1/M 期のマーカーである *CycB1;1:GUS* 遺伝子を用いて、DNA 損傷や細胞周期阻害剤を与えたときの細胞周期の状態を観察した。その結果、*rad26* および *atr* バックグラウンドにおいては、ガンマ線処理後における GUS 活性の蓄積量や蓄積の持続性が弱く、G1/M 期におけるチェックポイント反応が正常に働かなかった。同様の結果は、変異体にアフィディコリン処理を行った際にも観察された。このことから、*AtRAD26* 遺伝子のチェックポイント機構への関与が強く

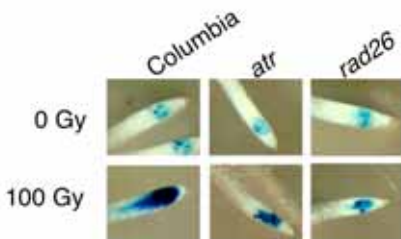


図 2 ガンマ線照射したシロイヌナズナ根端におけるCYCB1;1:GUSの発現

示唆された (図 2)。

(3) *AtRAD26* の cDNA の全長を酵母転写因子の DNA 結合ドメイン及び転写活性化ドメインのコード領域の下流に組み込み、両遺伝子産物間の相互作用を調べた結果、*AtRAD26* 蛋白質は酵母細胞内で 2 量体を形成することがわかった。さらに、*AtRAD26* の cDNA をいくつかの領域に分割し、*AtRAD26*-NT (コイルドコイル領域を含む N 末領域)、*AtRAD26*-NT2 (コ

イルドコイル領域を含まない N 末領域) または *AtRAD26*-CT (C 末領域) に分割し、ドメイン間の相互作用を検証した結果、両蛋白質がコイルドコイル領域を含む場合には相互作用が見られたが、どちらか一方がこの領域を欠くと相互作用が失われた。このことから、コイルドコイル領域が *AtRAD26* の 2 量体形成に必須であることが明らかになった。

(4) *AtRAD26* が *AtATR* などのセンサーキナーゼによってリン酸化されるかどうかを調べるため、大腸菌中で発現させた *AtRAD26* と植物組織から抽出した核蛋白質画分を [γ - 32 P]ATP の存在下で混合し、*AtRAD26* への 32 P の取り込みを解析した。その結果、野生型の植物由来の抽出画分では、強い 32 P の取り込みが見られたが、*AtATR* 欠損株由来の抽出画分では取り込みが半減した。一方、*AtATR* のリン酸化サイトと思われる 2 箇所のセリン残基をアラニンに置換した変異 *AtRAD26* を用いると、 32 P の取り込みが減少する傾向が見られた。以上の結果から、*AtRAD26* のセリン残基が *AtATR* を主体としたセンサーキナーゼによってリン酸化される可能性が示唆された。

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 3 件)

H.J. Anderson, E.J. Vonarx, L. Pastushok, M. Nakagawa, A. Katafuchi, P. Gruz, A. Di Rubbo, D.M. Grice, M.J. Osmond, A.N. Sakamoto, T. Nohmi, W. Xiao, and B.A. Kunz. Arabidopsis thaliana Y-family DNA polymerase \cdot catalyses translesion synthesis and interacts functionally with PCNA2. Plant J. 55, 895-908 (2008)、査読あり

A.N. Sakamoto, J.E. Stone, G.E. Kissling, S.D. McCulloch, Y.I. Pavlov and T.A. Kunkel. Mutator alleles of yeast DNA polymerase \cdot . DNA Repair 6, 1829-1838 (2007)、査読あり

S. Takahashi, A.N. Sakamoto, A. Tanaka and K. Shimizu. AtREV1, a Y-family DNA polymerase in Arabidopsis, has deoxynucleotidyl transferase activity in vitro. Plant Physiol. 145, 1052-1060 (2007)、査読あり

[学会発表](計 11 件)

高野成央、高橋裕子、山本充、寺西美香、横沢大輔、長谷純宏、坂本綾子、田中淳、日出間純「イオンビーム誘発 UVB 耐性変異体イネの解析」第 50 回日本植物生理学会年会

平成 21 年 3 月 21 日～24 日、名古屋大学東山
キャンパス（名古屋市）

坂本綾子、中川 繭、鳴海一成、「シロ
イヌナズナのチェックポイント機構に關与
する AtRAD26 蛋白質の解析」第 50 回日本植
物生理学会年会、平成 21 年 3 月 21 日～24 日
名古屋大学東山キャンパス（名古屋市）

中川繭、高橋真哉、坂本綾子、田中淳、
鳴海一成、「シロイヌナズナの損傷乗り越え
欠損の突然変異頻度に及ぼす影響」第 3 回高
崎量子応用研究シンポジウム、2008 年 10 月
高崎シティギャラリー（高崎市）

中川繭、坂本綾子、高橋真哉、田中淳、
鳴海一成、「シロイヌナズナの突然変異誘発
遺伝子の解析」日本植物学会 72 回大会、平
成 20 年 9 月 24 日～27 日、高知大学朝倉キャン
パス（高知市）

A.N. Sakamoto, M. Nakagawa, S.
Takahashi, K. Shimizu, A. Tanaka and I.
Narumi. Translesion Synthesis and
Mutagenesis in Higher Plants. 10th
International Workshop on Radiation
Damage to DNA June 8-12, 2008, Urabandai,
Fukushima

坂本綾子、中川 繭、佐藤勝也、鳴海一
成「シロイヌナズナ *AtRAD26* 遺伝子は損傷チ
ェックポイントに關与する」第 49 回日本植
物生理学会年会、平成 20 年 3 月 20 日～22 日、
札幌コンベンションセンター（札幌市）

中川繭、坂本綾子、高橋真哉、田中淳、
鳴海一成「シロイヌナズナ *REV3*、*REV1* 欠損
変異体における突然変異頻度の解析」第 30
回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生
化学会大会合同大会、平成 19 年 12 月 11 日～
15 日、パシフィコ横浜・ヨコハマグランドイ
ンターコンチネンタルホテル（横浜市）

坂本綾子、高橋真哉、岩井成憲、清水喜
久雄、「シロイヌナズナの DNA ポリメラー
ゼ・と *REV1* 蛋白質の解析」第 30 回日本分
子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会
合同大会、平成 19 年 12 月 11 日～15 日、パシ
フィコ横浜・ヨコハマグランドインターコン
チネンタルホテル（横浜市）

坂本綾子、高橋真哉、中川繭、田中淳、
清水喜久雄、鳴海一成、「高等植物における
DNA 損傷乗り越え複製機構と紫外線感受性」
第 50 回日本放射線影響学会大会、平成 19 年
11 月 14 日～17 日、幕張メッセ国際会議場 千
葉市）

M. Nakagawa, A. Sakamoto, S. Takahashi,
A. Tanaka and I. Narumi. Does Arabidopsis
have translesion syntheses? Plant Biology
and Botany 2007 Joint Congress, 7-11 July,
2007, Chicago, USA

A. Sakamoto, M. Nakagawa, S. Takahashi
and A. Tanaka. Functional analysis of DNA
polymerase zeta and *REV1* protein in
Arabidopsis. EMBO Workshop "Plant DNA
Repair and Recombination", 31 May - 3 June,
2007, Presqu'île de Giens, France

〔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〕
[http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/grr/
index_j.html](http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/grr/index_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 綾子 (SAKAMOTO N. AYAKO)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子
ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号：00354960

(2) 研究分担者

中川 繭 (NAKAGAWA MAYU)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子
ビーム応用研究部門・博士研究員
研究者番号：10375438
(平成 19 年度)

(3) 連携研究者

中川 繭 (NAKAGAWA MAYU)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子
ビーム応用研究部門・博士研究員
研究者番号：10375438
(平成 20 年度)