

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06690

研究課題名(和文)アクチン脱重合因子による新規核内DNA倍加制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanism regulating endoreplication by ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR

研究代表者

稲田 のりこ (Noriko, Inada)

大阪公立大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：30432595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「シロイヌナズナのアクチン脱重合因子(ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR、ADF)の変異体は植物サイズ増大と核内DNA倍加亢進を示す」という発見に基づき、ADFを介した核内DNA倍加亢進機構の解明を目的とした。adfの植物サイズ増大・核内DNA倍加亢進の表現型は、LED型培養槽よりも蛍光灯型培養槽でより顕著に見られることを明らかにした。蛍光灯はLEDよりも紫外線強度が高いこと、adfはDNA損傷誘導薬剤に対する感受性が高くなることから、adfではDNA損傷修復機能に異常が起きており、蓄積したDNA損傷が核内DNA倍加の亢進を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内DNA倍加は、植物の発生や形態形成に重要な役割を果たしている。本研究結果は、核内DNA倍加の制御機構の解明につながるという学術的意義を持つ。また、研究代表者のこれまでの研究により、シロイヌナズナのadf変異体は糸状菌病原体によって引き起こされるうどんこ病に対して抵抗性を亢進させることが明らかになっている。病害抵抗性の亢進と植物サイズの増大という両方の表現型を持つadf変異体の解析は、食料問題の解決につながる「病気に強く大きく育つ」農作物の作成に向けた基盤を形成するという社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We found that *Arabidopsis thaliana* adf mutants show an increase of plant size and enhancement of endoreplication. In this study, we aimed to clarify the role of ADF in regulation of endoreplication. We found that the phenotype of adf related to plant size and endoreplication was more significantly observed when plants were grown in the growth chamber equipped with fluorescent lamp rather than LED. Fluorescent lamp emitted more UV light compared to LED. adf mutants showed increased sensitivity against a reagent that induces DNA damage. Based on those findings, a role of ADF in DNA damage repair was suggested. It was assumed that impaired DNA damage repair causes accumulation of DNA damage, which had been shown to induce an enhancement of endoreplication, in adf mutants.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核内DNA倍加 アクチン脱重合因子 植物成長

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

核内 DNA 倍加は、細胞周期において、細胞分裂を伴わずに DNA 複製が繰り返されることによって起きる現象である。核内 DNA 倍加の亢進は、DNA 量の増加とともに、多くの場合において細胞サイズの増大とそれに伴う生物サイズの増大を引き起こす (De Veylder et al., 2011)。植物においては、核内 DNA 倍加の人為的な亢進は、大きな作物を作ることに応用されており、食糧問題や植物資源の増量にもつながるため、その機構解明は重要な課題である。

研究代表者らはこれまでに、シロイヌナズナのアクチン脱重合因子 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR, ADF) に関する研究を進めてきた。シロイヌナズナのゲノムには 11 個の ADF 遺伝子がコードされており、アミノ酸配列の相同性から 4 つのサブクラスに分類されている。このうち ADF1~4 を含むサブクラス I の ADF は、いずれも植物体全体で比較的高い発現を示す (Ruzicka et al., 2007)。我々はこれまでに、サブクラス I に属する ADF4 のノックアウト変異体、および、サブクラス I に含まれる 4 つの ADF の発現を抑制した形質転換体 (ADF1-4 発現抑制株) が、糸状菌病原体によって引き起こされるうどんこ病に対して抵抗性の亢進を示すこと (Inada et al., 2016)、また同時に核内 DNA 倍加の亢進と植物サイズの増大を示すこと (Inada et al., 2021) を見出した。

シロイヌナズナを用いた変異体解析により、これまで多数の核内 DNA 倍加制御因子が単離されているが、核内 DNA 倍加を亢進する変異体は必ずしも植物サイズの増大を示さない (Inada et al., 2021 に概説)。また、病害抵抗性の亢進は、一般的には植物成長を抑制すると考えられている (Bowling et al., 1997; Su et al., 2018)。植物サイズの増大と核内 DNA 倍加の亢進、そして病害抵抗性の亢進を同時に示す *adf* 変異体の解析は、「病気に強く大きく育つ」植物を作成する基盤として貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、シロイヌナズナの *adf4* および ADF1-4 発現抑制株が植物サイズの増大と核内 DNA 倍加の亢進を示すという研究代表者の発見に基づいて、ADF が核内 DNA 倍加を制御する機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光強度と光の種類が *adf* 変異体の植物サイズと核内 DNA 倍加に与える影響の解析
「シロイヌナズナのサブクラス I *adf* 変異体は植物サイズの増大と核内 DNA 倍加の亢進を示す」という本研究の元になった発見は、研究代表者の前所属において、蛍光灯型培養槽を用いて行われたものであった。一方、現所属において新たに購入した LED 型培養槽で植物を育成したところ、植物サイズと核内 DNA 倍加に関する *adf4*、ADF1-4 発現抑制株の表現型が顕著には見られないことが明らかになった。この予備結果をもとに本研究では、蛍光灯型培養槽と LED 型培養槽とを併用し、野生型および *adf4*、ADF1-4 発現抑制株のサイズと核内 DNA 倍加に与える影響を解析した。また、光強度が核内 DNA 倍加に与える影響が報告されているため (Tanaka et al., 2016)、光強度の変化が野生型および *adf4*、ADF1-4 発現抑制株のサイズと核内 DNA 倍加に与える影響についても解析した。

これらの解析については、蛍光灯型培養槽、および、LED 型培養槽を用い、光強度を 10~140 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ に振って、22°C、24 時間光照射下で 1/2MS プレートに撒いたシロイヌナズナ植物を生育し、第一葉の大きさを経時的に測定した。また、播種後 20~24 日目の完全に展開した第一葉をプロイディアナライザーに供し、そのプロイディを解析した。

(2) DNA 損傷処理の解析

蛍光灯と LED の違いとして、紫外線の有無が考えられた。蛍光灯型培養槽と LED 型培養槽とで比較したところ、可視光の光強度が 10~140 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ のときに、どの場合においても LED 培養槽の紫外線強度は 0 $\mu\text{W/cm}^2$ だったが、蛍光灯培養槽では可視光の光強度が 30 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ のときは 1~2 $\mu\text{W/cm}^2$ 、100/140 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ のときは 4~5 $\mu\text{W/cm}^2$ であった。

紫外線の照射は DNA 損傷を誘導するが、DNA 損傷の蓄積は核内 DNA 倍加の亢進を引き起こすことが報告されている (Adachi et al., 2011)。また研究代表者のこれまでの研究において、シロイヌナズナ ADF は細胞核内で何らかの機能を有していることがわかっている

(Inada et al., 2016)。動物細胞では、細胞核内で一過的に形成されるアクチン繊維が、DNA 損傷修復に働くことが報告されている (Hurst et al., 2019)。以上の知見から我々は、ADF が細胞核内においてアクチン繊維の形成と DNA 損傷修復に機能しているとの仮説を立てた。*adf4*、ADF1-4 発現抑制株では DNA 損傷修復に異常が起きて DNA 損傷が蓄積しており、DNA 損傷の蓄積が核内 DNA 倍加の亢進を引き起こしていると考えられる。この仮説に基づいて、*adf4*、ADF1-4 発現抑制株は DNA 損傷誘導薬剤に対して感受性の増大を示すことが予想された。この予想を検証するため、DNA 損傷を誘導するゼオシンを様々な濃度で含む 1/2 MS 培地を作成し、野生型および *adf4*、ADF1-4 発現抑制株の種を撒いて 22°C、24 時間光照射の LED 培養槽

で生育させ、7日目の根の長さを測定し、比較することで、DNA 損傷誘導薬剤に対する感受性を解析した。

4. 研究成果

(1) 光強度と光の種類が *adf* 変異体の植物サイズと核内 DNA 倍加に与える影響の解析
LED 型培養槽と蛍光灯型培養槽のそれぞれにおいて、光強度を 10~140 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ に調節し、それぞれの条件で経時的に第一葉の大きさを測定した。その結果、LED 型培養槽では、10、35、100 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ などいくつかの光強度条件において、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株のサイズ増大が確認された。しかしながらいずれの条件においても、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株における核内 DNA 倍加の亢進は観察されなかった。一方、蛍光灯型培養槽では、光強度 100、140 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ で育成させたときに、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株において植物サイズが増大すること、また *ADF1-4* 発現抑制株の核内 DNA 倍加が亢進することが明らかになった。

以上の結果から、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株における植物サイズ増大と核内 DNA 倍加亢進の表現型が、光強度や光の種類依存的であることを明らかにするとともに、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株において安定して核内 DNA 倍加が亢進する条件を同定した。

(2) DNA 損傷処理の解析

DNA 損傷誘導薬剤として用いられるゼオシンを、5 μM 、10 μM 、20 μM 含む 1/2 MS 培地、および、コントロールとして DMSO を含む培地に播種し、生育後 7 日目の根の長さを測定した。その結果、ゼオシン含量 20 μM の培地において、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株の根の長さが野生型と比較して有意に短くなること、つまり *adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株はゼオシンに対する感受性が野生型よりも高いことが明らかになった。

本研究成果により、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株において核内 DNA 倍加亢進を誘導する生育条件が同定された。今後は、この条件を用いて、核内 DNA 倍加亢進時の遺伝子発現解析を通し、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株における核内 DNA 倍加亢進の分子メカニズムを明らかにする。さらに、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株で DNA 損傷が蓄積するという仮説をさらに検証することにより、DNA 損傷修復と核内 DNA 倍加の制御における ADF の機能を明らかにする。

<引用文献>

- Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., and Umeda, M. (2011) Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Sciences, U.S.A.* 108, 10004-10009.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X. (1997) The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* 9, 1573-1584.
- De Veylder et al., 2011 *Trends in Plant Science* 16, 624-634
- Hurst, V., Shimada, K., Gasser, S.M. (2019) Nuclear actin and actin-binding proteins in DNA repair. *Trends in Cell Biology* 29, 462-476.
- Inada, N., Higaki, T., and Hasezawa, S. (2016) Nuclear function of subclass I Actin-Depolymerizing Factor contributes to susceptibility in *Arabidopsis* to an adapted powdery mildew fungus. *Plant Physiology* 170, 1420-1434.
- Inada, N., Takahashi, N., and Umeda, M. (2021) *Arabidopsis thaliana* subclass I ACTIN DEPOLYMERIZING FACTORS and vegetative ACTIN2/8 are novel regulators of endoreplication. *Journal of Plant Research* 134, 1291-1300.
- Ruzicka, D.R., Kandasamy, M.K., McKinney, E.C., Burgos-Rivera B., and Meagher, R.B. (2007) The ancient subclasses of *Arabidopsis* Actin Depolymerizing Factor genes exhibit novel and differential expression. *Plant Journal* 52, 460-472.
- Su, J., Yang, L., Zhu, Q., Wu, H., He, Y., Liu, Y., et al. (2018) Active photosynthetic inhibition mediated by MPK3/MPK6 is critical to effector-triggered immunity. *PLOS Biology* 16, e2004122.
- Tanaka, R., Amijima, M., Iwata, Y., Koizumi, I., and Mishiba, K. (2016) Effect of light and auxin transport inhibitors on endoreduplication in hypocotyl and cotyledons *Plant Cell Reports* 35, 2539-2547.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Inada, N., Takahashi, N., and Umeda, M.	4. 巻 134
2. 論文標題 Arabidopsis thaliana subclass I ACTIN DEPOLYMERIZING FACTORS and vegetative ACTIN2/8 are novel regulators of endoreplication.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 1291-1300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-021-01333-0	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 -

〔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
研究分担者	尾形 善之 (Ogata Yoshiyuki) (90446542)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403)	

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