

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06697

研究課題名(和文)植物の多細胞化と陸上進出に伴い進化したゲノム恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the genome stability mechanism that evolved with the multicellularization of plants and their expansion onto land

研究代表者

愿山 郁 (Yoshiyama, Kaoru)

東北大学・生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：10346322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では基部陸上植物であるゼニゴケのDNA損傷応答について明らかにし、シロイヌナズナと比較することで、ゲノム恒常性維持機構が、進化の過程でどのように変化してきたかを検討した。ゼニゴケにおいてもDNA損傷が生じるとDNA修復やDNA損傷に反応した遺伝子群が活性化するが、その制御方法はナズナとは異なっていた。ナズナのDNA損傷応答のマスターレギュレーターSOG1転写因子に近いゼニゴケMpNAC9は、DNA損傷応答の制御の一部は担っているものの、主な働きとしては活性酸素消去系の制御であった。ゼニゴケでDNA損傷応答を主に統括している因子は、水中植物から受け継がれた因子である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷応答は、ゲノムの恒常性を維持する機構であるため、生育様式や生育環境によってDNA損傷応答がどのように変化してきたかを理解することは重要である。さらに近年、DNA損傷応答が低温、高塩濃度、アルミニウムや病原菌の感染といった環境ストレス応答とも密接に関連しているという報告が次々となされている。つまりDNA損傷応答の理解は、環境ストレス応答の理解につながり、本研究で明らかになった陸上植物に普遍的、またはある植物に特異的なDNA損傷応答の知見を足がかりとして、新たな手法による環境ストレス耐性植物の開発といった応用面へ発展する可能性が大いにある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the DNA damage response in *M. polymorpha*, which is located at the base of land plants, and compared it with *A. thaliana* to examine how the maintenance of genome stability has changed during their evolution. When DNA damage occurs in *M. polymorpha*, a group of genes that respond to DNA repair and DNA damage were activated, but the method of regulation was different from that in *A. thaliana*. *M. polymorpha* MpNAC9, which is close to the transcription factor SOG1, the master regulator of the DNA damage response in *A. thaliana*, played a part in regulating the DNA damage response, but its main function was to regulate the reactive oxygen scavenging system. It was suggested that the factor that mainly controls the DNA damage response in *M. polymorpha* may be a factor inherited from water plants.

研究分野：植物分子遺伝

キーワード：DNA損傷 DNA損傷応答 植物 DNA修復 転写レスポンス 細胞周期 ゼニゴケ 植物進化

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム恒常性維持のために必須となる DNA 損傷応答についての研究は、これまで植物では主にシロイヌナズナを用いて行われてきた。ナズナでは DNA 損傷の認識を行うセンサータンパク質、またシグナル伝達の上流で働くリン酸化酵素 (ATM や ATR) は、動物の DNA 損傷応答に関わる因子のオルソログとして同定され、その働きも動物と植物で共通している。しかし、動物の DNA 損傷応答のシグナル伝達を統括する転写因子 p53 (ガン抑制遺伝子) のオルソログは植物には存在しない。植物は SOG1 という、p53 とはアミノ酸配列の全く異なる NAC 型転写因子が p53 の機能を担っていることが明らかとなった。つまり植物は独自に SOG1 を獲得したと考えられる。それでは植物は、SOG1 を介した DNA 損傷応答機構を進化の過程の中でいつ獲得したのか？ また進化の過程において、DNA 損傷応答をどのように変化させてきたのか？ この問いに対する答えを求め本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ゲノムの恒常性維持機構が、植物の進化の過程でどのように変化してきたのか？ さらには植物独自の DNA 損傷応答因子であり、動物 p53 と同じ機能を持つ SOG1 を植物は進化の過程でいつ獲得したのかを解明することを目的とする。この目的を達成するため、植物が陸上に進出した後、最も早い時期に独自に進化し、かつ遺伝子重複が少ないゼニゴケを用いて実験を行った。

## 3. 研究の方法

ゼニゴケには NAC 型転写因子が 9 つ存在するが、その中にナズナ SOG1 と相溶性が高いものが存在するかどうかを調べた。SOG1 オルソログ候補が見つければ、その遺伝子の欠損体を作製し、DNA 損傷に対する感受性を野生型と比較した。DNA 損傷の誘導には、DNA の二本鎖切断、一本鎖切断、活性酸素による傷などを誘導する X 線を用いた。DNA 損傷に応答した、DNA 複製の停止や、転写レスポンス反応が活性化されているかどうかを検討した。そしてゼニゴケ SOG1-like な遺伝子を破壊し、その表現型や転写レスポンスを調べ、SOG1-like がゼニゴケにおいてどのような働きを担っているかを明らかにし、ナズナ SOG1 の働きを比較した。その比較により、陸上基部植物ゼニゴケと植物進化の末端に位置するナズナの DNA 損傷応答には共通点があるか、またはどのように変化してきたのかを理解した。

## 4. 研究成果

### 1) 野生型ゼニゴケの X 線照射に対する感受性の評価

野生型ゼニゴケに X 線 50Gy, 100Gy を照射し、その生育を観察した。50Gy 照射、100Gy 照射ともに照射後 7 日目では生育が抑制されていた。さらにメリステム部分が黒くなっており、細胞分裂が活発な組織の感受性が高かった (図 1)。また 50Gy 照射では照射後 14 日目から、また 100Gy 照射では 21 日目から新しい組織が再生してきた。このような再生はナズナでは観察されず、ゼニゴケ特有の性質であった。

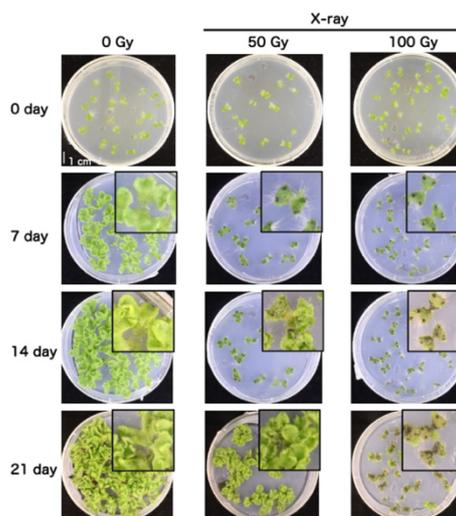


図1 野生型ゼニゴケのX線感受性  
X線照射後7日目では、生育が阻害され、メリステムが黒く変化している。50Gy照射では14日目から、100Gy照射では21日目から新しい組織が再生している。

## 2) ゼニゴケにおけるナズナ SOG1 オルソログの探索

ナズナ SOG1 は NAC 型転写因子ファミリーに属する。ゼニゴケにも NAC ドメインを持つタンパク質は 9 つ存在する。これらの中にナズナ SOG1 と相同の NAC タンパク質が存在するかどうかを調べるため、NAC ドメインの cDNA 配列で、ゼニゴケのすべての NAC タンパク質とナズナの SOG1、そしていくつかの他のナズナ NAC タンパク質を用いて系統樹を作成した。その結果、MpNAC9 がナズナ SOG1 と同じグループに属することが示された (図 2A)。ナズナ SOG1 と MpNAC9 のアミノ酸配列を比較すると、ナズナ SOG1 に特徴的な C 末端に存在する 5 つの SQ (セリン-グルタミン) 配列のうち C 末端に一番近い位置と似通った位置に SQ が一つ存在していた (図 2B)。MpNAC9 がナズナ SOG1 のオルソログかどうかをさらなる実験によって調べる必要が出てきた。

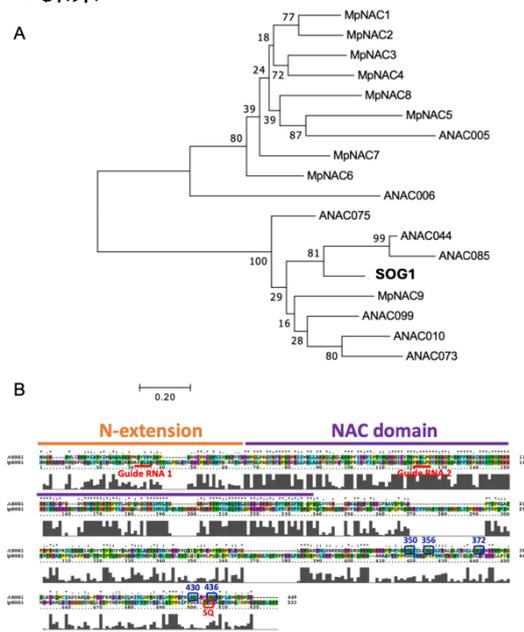


図2 ナズナSOG1、ナズナNACの一部とゼニゴケNACから作製した系統樹 (A) それぞれのNACドメインのcDNA配列を用いて系統樹を作製した。(B) ナズナ SOG1 と MpNAC9 のアミノ酸アライメント

## 3) ゼニゴケ MpNAC9 欠損体における X 線感受性

MpNAC9 がナズナ SOG1 のオルソログであるかを検討するために、CRISPR-Cas9 システムにより MpNAC9 の N 末端 (*mpnac9-1*) と NAC ドメイン内に変異が導入された (*mpnac9-2*) 機能欠損体を作製し、それらの X 線感受性を調べた。25 Gy の X 線を照射して 5 日目での生育は、野生型は X 線照射していないものと変わらなかったが、*mpnac9-1* と *mpnac9-2* 変異体では阻害され、メリステムは黒く変色し、野生型よりも感受性を示した (図 3)。よって、MpNAC9 はゼニゴケにおいて X 線照射応答に関与していると考えられた。

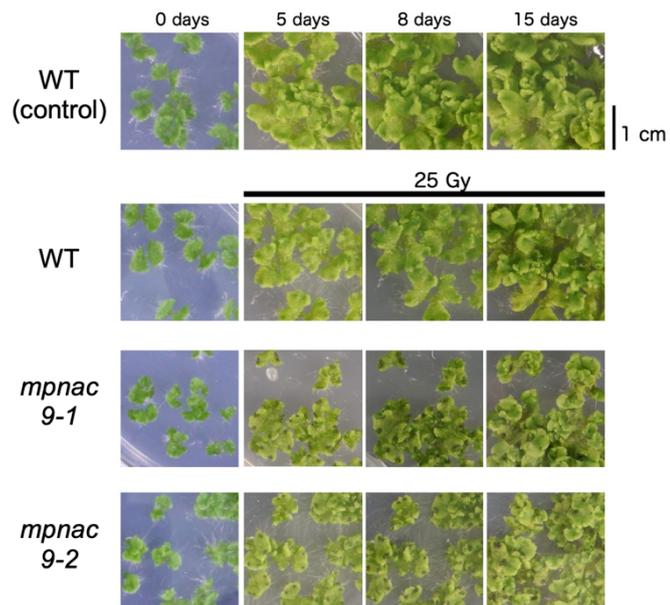


図3 *mpnac9*変異体のX線感受性

X線照射後5日目では、野生型は生育が少し阻害されているが、メリステムは黒くはない。*mpnac9-1*と*mpnac9-2*変異体では生育が阻害され、メリステムが黒く変化している。

## 4) MpNAC9 の局在確認

X 線照射への応答反応に関与している MpNAC9 が、ゼニゴケのどこで発現しているのかを調べるために、MpNAC9-GUS と MpNAC9-Citrin コンストラクトを作製し、*mpnac9* 変異体に導入した。これらのラインから、MpNAC9 は葉状体のメリステム領域で発現し (図 4A,B)、また細胞内では核に局在することが明らかになった (図 4C)。つまり MpNAC9 は細胞分裂が活発な組織で機能する転写因子であると考えられ、ナズナ SOG1 とその特徴は似通っていた。

## 5) X 線照射に応答した DNA 複製の停止

X 線照射によって DNA 上に損傷が生じると、細胞周期チェックポイントが活性化さ

れ、DNA複製が停止する。ゼニゴケにおいてもこのようなチェックポイント機構が活性化されるかどうかを調べるため、EdU取り込み実験を行った。野生型では50 GyのX線を照射して3時間後にはEdUのfociが消失し、DNA複製が停止していることが示されたが、*mpnac9*変異体ではEdUのfociが残っていた(図5A, B)。つまりDNA損傷に応答した複製フォークの停止にMpNAC9が関与していることが示された。このMpNAC9の働きはナズナSOG1と同じであった。

### 5)ゲノムワイドな転写レスポンスの解析

ナズナにおいては、ガンマ線照射によって、数千の遺伝子の発現が変動し、そのほとんどがSOG1によって制御されていることが知られている。そこでゼニゴケにX線を照射後2時間でRNAを回収し、RNA-seq解析することで、転写量が変動する遺伝子を同定した。野生型では3200個ほどの遺伝子の転写量が変動していた。ゼニゴケMpNAC9もナズナSOG1と同様に、これら変動遺伝子の制御を行っているかを調べるため、*mpnac9*変異体も用いてRNA-seq解析を行った。その結果、野生型で変動していた遺伝子の65%が*mpnac9*変異体では変動しなくなったため、これらはMpNAC9が制御していたと考えられた。次にこれら遺伝子を発現変動のパターンでグループ分けした。ナズナではSOG1が、DNA修復やDNAダメージレスポンス、細胞周期を負に制御する遺伝子を誘導し、一方で、複製の進行に関わる遺伝子は抑制している。興味深いこ

とに、ゼニゴケではX線照射後、MpNAC9に依存して発現が上昇する遺伝子に、DNA修復やDNAダメージレスポンスに関する遺伝子は多く無く、銅シャペロン遺伝子が多く含まれていた。銅シャペロンは活性酸素消去系SODタンパク質に必須となる銅イオンの供給に重要である。よってMpNAC9は活性酸素消去系の活性化を制御していると言えた。ゼニゴケにおいて、もちろんDNA修復やDNAダメージレスポンスに関与する遺伝子はもちろん活性化していたが、MpNAC9が欠損していても、それらの発現は全く変化がないか、少し発現が低下する程度であった。つまりゼニゴケでは、MpNAC9以外の因子がこれらの遺伝子制御を行っていると考えられた。

### まとめ)ナズナSOG1の相同遺伝子ゼニゴケMpNAC9の機能

以上の結果から、ゼニゴケではX線照射を受けると活性酸素消去系を活性化することが重要であり、その制御を主にMpNAC9が担っていることを明らかにした。さらにゼニゴケではDNA修復やDNAダメージレスポンスに関する遺伝子の制御の一部にMpNAC9は関与しているが、他の因子が、主にこれら遺伝子の制御を行っていることを示した。よってゼニゴケMpNAC9はナズナSOG1のプロトタイプであり、進化の過程でMpNAC9のコピー数が増える間にDNA損傷応答に特化したナズナSOG1が出現

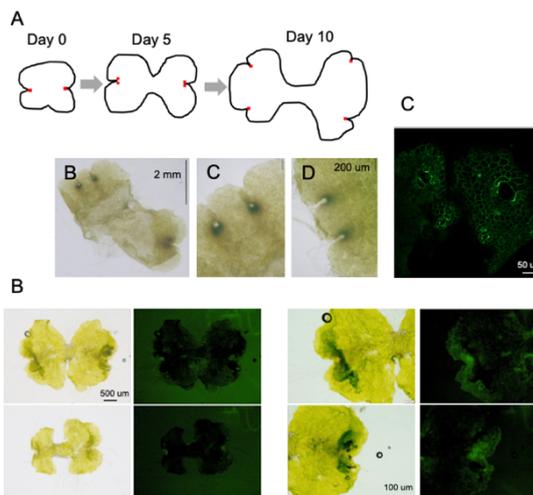


図4 MpNAC9の発現部位

(A)ゼニゴケのメリステムがGUS染色により青く染まっている。(B)ゼニゴケのメリステム領域が蛍光を発している。(C)細胞内の核からシトリン蛍光が観察される。

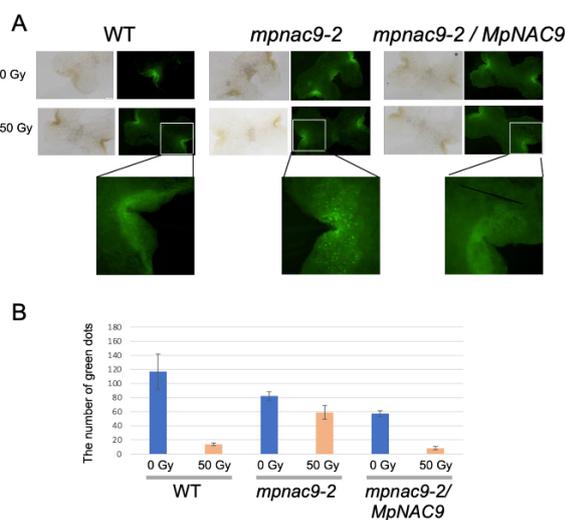


図5 DNA損傷に応答したDNA複製の停止

(A)野生型、*mpnac9-2*、*mpnac9-2/MpNAC9*にX線を照射し、3時間後にEdU取り込み解析を行った。野生型ではEdUの取り込みが阻害されているが、*mpnac9-2*では阻害されていない。そしてMpNAC9で相補したラインではEdUの取り込みが阻害されている。(B) EdU fociの数。青い棒はX線照射無し、ピンクの棒は50Gy照射の結果を表している。

したと考えられる。そしてゼニゴケではDNA損傷応答を他の因子が主に制御しており、それは水中植物から受け継がれてきたものである可能性が考えられた。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Pengliang Wei, Manon Demulder, Pascale David, Thomas Eekhout, Kaoru Okamoto Yoshiyama, Long Nguyen, Ilse Vercauteren, Dominique Eeckhout, Margot Galle, Geert De Jaeger, Paul Larsen, Dominique Audenaert, Thierry Desnos, Laurent Nussaume, Remy Loris, and Lieven De Veylder | 4. 巻<br>33              |
| 2. 論文標題<br>Arabidopsis casein kinase 2 triggers stem cell exhaustion under AI toxicity and phosphate deficiency through activating the DNA damage response pathway   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>The PLANT CELL   | 6. 最初と最後の頁<br>1361-1380 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/plcell/koab005  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Momo Otake1, Kaoru Okamoto Yoshiyama, Hiroko Yamaguchi, Jun Hidema  | 4. 巻<br>20              |
| 2. 論文標題<br>222 nm ultraviolet radiation C causes more severe damage to guard cells and epidermal cells of Arabidopsis plants than does 254 nm ultraviolet radiation | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Photochemical & Photobiological Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>1675-1683 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s43630-021-00123-w   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Ayako N. Sakamoto1   Tomoaki Sakamoto, Yuichiro Yokota, Mika Teranishi, Kaoru O. Yoshiyama, Seisuke Kimura | 4. 巻<br>12         |
| 2. 論文標題<br>SOG1, a plant-specific master regulator of DNA damage responses, originated from nonvascular land plants  | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Plant Direct   | 6. 最初と最後の頁<br>e370 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/pld3.370  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Momo Otake, Mika Teranishi, Chiharu Komatsu, Mamoru Hara, Kaoru Okamoto Yoshiyama, and Jun Hidema             | 4. 巻<br>195           |
| 2. 論文標題<br>Poaceae plants transfer cyclobutane pyrimidine dimer photolyase to chloroplasts for ultraviolet-B resistance | 5. 発行年<br>2024年       |
| 3. 雑誌名<br>PLANT PHYSIOLOGY  | 6. 最初と最後の頁<br>326-342 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/plphys/kiae060   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>愿山（岡本）郁、坂本智昭、木村成介、東谷篤志、日出間純        |
| 2. 発表標題<br>陸上植物進化の基部に位置するゼニゴケにおけるDNA損傷応答機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会 第94回大会                      |
| 4. 発表年<br>2022年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>愿山（岡本）郁、坂本智昭、木村成介、東谷篤志、日出間純        |
| 2. 発表標題<br>陸上植物進化の基部に位置するゼニゴケにおけるDNA損傷応答機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本植物生理学会 第64回大会                    |
| 4. 発表年<br>2023年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>愿山（岡本）郁、坂本智昭、木村成介、東谷篤志、日出間純  |
| 2. 発表標題<br>DNA damage response in Marchantia polymorpha, basal lineage of land plants |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会 第93回大会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>愿山（岡本）郁、坂本智昭、木村成介、日出間純 |
| 2. 発表標題<br>ゼニゴケにおけるDNA損傷応答        |
| 3. 学会等名<br>第62回 日本植物生理学会          |
| 4. 発表年<br>2021年                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>愿山(岡本)郁、東谷篤志、日出間純                |
| 2. 発表標題<br>植物進化の基部に位置するゼニゴケにおけるDNA損傷応答機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>第92回日本遺伝学会                       |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|