

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770047

研究課題名（和文） SOG1 を介した植物の DNA チェックポイント機構の解析

研究課題名（英文） The role of SOG1, a novel transcription factor, in the DNA damage checkpoint

研究代表者

愿山 郁 (YOSHIYAMA KAORU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：10346322

研究成果の概要（和文）：DNAチェックポイントとは、DNA上のダメージやDNA複製の進行阻害をモニターし、それらの問題が解決されるまでのあいだ細胞周期の進行を止める重要な仕組みである。本研究では動物とは異なるライフサイクルをもつ植物が独自に獲得したDNAチェックポイントの仕組みを明らかにする事を目的としている。本研究の結果、植物においては動物には存在しないSOG1 転写因子がDNAチェックポイントの初期に働く重要な因子であること、またSOG1 は分裂が活発な根端や茎頂の分裂組織で機能し、DNAがダメージを受けるとSOG1 タンパク質が翻訳後修飾を受けることなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：DNA can be damaged by extracellular and intercellular insults such as ionizing radiation, some chemical agents and reactive oxygen species. The damaged DNA must be repaired to prevent loss or incorrect transmission of genetic information. Therefore, eukaryotic cells have DNA checkpoint system, which arrests the cell cycle in response to damaged or incompletely replicated DNA to provide time for the cell for repair damaged chromosome before entering mitosis. The purpose of this project is to make clear the mechanism of plant specific DNA checkpoint system. As a result, we showed that SOG1 plays an important role in DNA checkpoint, SOG1 functions at the root apical meristems and the shoot apical meristems, and SOG1 protein is modified in response to DNA damage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：植物分子機能・DNAチェックポイント・DNAダメージ・細胞周期

1. 研究開始当初の背景

DNAチェックポイントとは、DNA上のダメージやDNA複製の進行阻害をモニターし、それらの問題が解決されるまでのあいだ細胞周期の進行を止める重要な仕組みである。細

胞がチェックポイントを失うと、ゲノム上の問題が解決されないまま細胞周期が進行してしまうため、ゲノムを安定に維持出来なくなる。動物のチェックポイント制御において中心的な働きをしているATMやATRはタンパク質キナーゼであり、ダメージの認識から

DNA修復や細胞分裂停止に関与する遺伝子群の活性化といったシグナル伝達を統括している。近年シロイヌナズナのゲノムデータベースから、ATMやATRのホモログが見つかり、さらにこのホモログは植物のチェックポイントタンパク質として動物と共通の働きを持っていることが明らかになった。動物で報告されているガン抑制遺伝子p53は、様々なストレスに反応して修復遺伝子や細胞周期を抑制する遺伝子の転写を活性化する転写因子であり、DNAチェックポイントにおいて重要な役割を担っている。ゲノムの安定性に関与しているガン抑制遺伝子p53のホモログが植物に存在するかの議論がこれまでに多くの研究者の間でなされてきたが、いまだ植物のp53ホモログに関する報告はなかった。

我々は以前に*sog1-1*変異体の原因遺伝子の同定と変異体の解析に従事してきた。*sog1-1*変異体はガンマ線照射に対して感受性を示す植物体のサプレッサー変異体として単離され(*xpf-2 sog1-1* サプレッサー変異体: DNAダメージが存在するにも関わらず細胞分裂が止まらないため、新しい葉の形成が進み、見かけ上ガンマ線耐性に見える)、その原因遺伝子は、植物の転写因子に共通して見られるNACドメインを持った機能未知の遺伝子であった。野生型の植物ではガンマ線照射後に多くの遺伝子の転写が誘導される事が報告されているが、*sog1-1*変異体ではその転写誘導がほとんど生じていなかったことから、SOG1はチェックポイント機構の中で中心的に働く転写因子であると考えられた。さらにSOG1は、DNAがダメージを受けた後の細胞分裂の停止やゲノムの安定性に重要である事が明らかになり、この特徴はp53と大変似通っている。しかしSOG1のアミノ酸配列にはp53との相同性が見られなかったことから、植物はp53とは異なったまったく独自のシステムとしてSOG1を獲得した可能性が示唆された。

2. 研究の目的

そこで本研究ではこの興味深いSOG1に着目し、さらなる解析を行う事によって、植物独自が獲得したチェックポイント機構について明らかにしたいと考えた。これは外界の様々なストレスの中で生育しなければならない植物が取った戦略を、進化的な観点から考えるにあたって大変重要であると考えられる。

これまで植物において、ダメージチェックポイントに関与する転写因子の存在が報告された例はなかった。しかし我々によるSOG1の発見は、これまで植物には存在しないと考えられていたp53の機能的ホモログを、植物は全く別のSOG1として独自に

獲得し保持している可能性を示している。そこでSOG1が本当に動物のp53のような役割を果たしているのかどうかを明らかにする事は大変重要であり、もしSOG1がp53の機能的ホモログであれば、これからの植物のダメージレスポンスに関する研究のブレークスルーになると考えられる。

またこれまでの遺伝学的な手法が主流であった植物のチェックポイント研究とは異なり、本研究では注目しているSOG1タンパク質を研究のコアとし、SOG1が結合するDNA配列や相互作用するタンパク質などから、チェックポイントの機構の全体像を明らかにしようとしており、この試みは独創的なものである。よって本研究から、植物におけるチェックポイントの新たな側面が明らかになることを期待している。

3. 研究の方法

1) 植物体におけるSOG1タンパク質の発現部位

DNAチェックポイントは、DNAダメージを認識し、直ちに細胞分裂を停止させ、DNAを修復する時間稼ぎをする仕組みである。よってDNAチェックポイントは細胞分裂が活発な組織において重要であり、細胞分裂を行っていない分化した組織においてDNAチェックポイントは機能していない可能性も考えられた。そこで、DNAチェックポイント因子であるSOG1タンパク質が発現している組織を*genomic SOG-GUS*コンストラクトを植物体に導入する事によって調べ、SOG1が植物体のどの部位で機能しているかを明らかにした。

2) SOG1タンパク質の細胞内局在

SOG1は転写因子であることから、おそらく核に局在すると予想される。しかし動物の転写因子p53はDNAダメージに反応して細胞質から核内に移行し、様々な遺伝子の転写を活性化することが報告されている。そこで、SOG1もDNAダメージに依存してその局在部位を変化させるのか、あるいは局在を変化させることなく、常に核に局在しているのかを検討した。そのためにSOG1 3'末にGFPを融合させた*genomic SOG1:GFP*を植物体に導入し、ダメージの有無による細胞内での蛍光パターンを比較することでSOG1タンパク質の挙動を細胞レベルで調べた。

3) SOG1と相互作用するタンパク質の探索

SOG1 がマルチマーを形成している可能性や、SOG1 と他のタンパク質が複合体を形成してターゲット遺伝子の転写を制御している可能性について検討した。方法としてはYeast-two-hybrid法を用いた。

4) SOG1 タンパク質修飾の解析

動物のp53 のN末はATM依存的にリン酸化され、そのリン酸化によってp53 タンパク質自身が安定化し、転写因子としての活性が上昇する事が報告されている。またp53 の別の部位のリン酸化は、細胞周期を停止させDNAを修復するか、あるいは細胞をアポトーシスの経路に導くかが決定しているとも考えられており、p53 のリン酸化が細胞の運命決定に大変重要な役割を果たしていると予想されている。実際SOG1 の転写量はDNAダメージを与えても上昇しないことから、SOG1 はタンパク質修飾によって、シグナル伝達経路を変化させている可能性が考えられた。そこで、SOG1 タンパク質はDNAダメージを与えることで修飾されるのかどうかを検討した。SOG1 のC末端にはATMのターゲットとなるSQモチーフが複数存在するため、SOG1 がリン酸化を受けている可能性が高いのではないかと考えた。そこでSOG1 タンパク質を容易に精製出来るようにするために、SOG1-10xmycを植物体に導入し、ガンマ線を照射する事でDNAダメージを与えた植物体と与えないコントロール植物体から抽出したタンパク質を用いて、SOG1 タンパク質をmyc抗体で同定した。そしてSOG1 タンパク質の挙動をガンマ線照射をした場合としなかった場合で比較し、SOG1 が修飾されているかどうかを調べた。

上記の実験で用いたGUS、GFPあるいは10xmycタグが結合したSOG1 は、Gatewayクローニングシステムを用いて植物形質転換用のベクターに導入した。また、これらのタグ付きSOG1 が本来のSOG1 と同様に機能するかどうかは、*sog1-1* 変異植物体にこのSOG1-TagのDNA断片を形質転換導入し、その*sog1-1* の表現系が抑制されるか否かによって確認した。

4. 研究成果

1) 植物体におけるSOG1 タンパク質の発現部位

植物体にgenomic SOG1-GUSコンストラクトを導入した植物を用いてSOG1 の発現部位を調べたところ、SOG1 は細胞分裂が活発な茎頂分裂組織や根端分裂組織でのみ発現している事を示した。この結果は、植物においてもDNAチェックポイントは細胞分裂が活発な組織でのみ機能しており、分化の進んだ組織においては必要ないことを明らかにした(図1)。

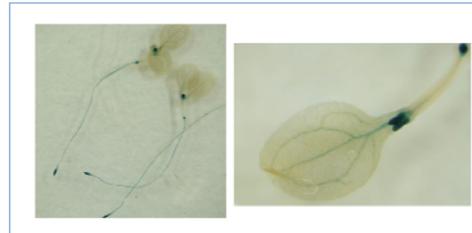


図1 SOG1 の発現部位

2) SOG1 タンパク質の細胞内局在

SOG1 の細胞内局在を確認するためにSOG1 のC末端にGFPを結合させたコンストラクトを植物体内に導入したところ、SOG1 は転写因子の典型的な局在部位である核に存在していることが明らかになった(図2)。



図2 SOG1 タンパク質の細胞内局在

さらにSOG1 の局在がDNAダメージの有無によって変化する可能性が考えられたが、SOG1 の挙動はダメージによって変化せず、SOG1 は常に核に局在していることが明らかになった。

3) SOG1 と相互作用するタンパク質の探索

Yeast-two-hybrid法によってSOG1 タンパク質と相互作用する因子を同定した。初めにSOG1 タンパク質の全長をbait vectorにクローニングしたところ、SOG1 タンパク質のみでレポーター遺伝子の転写を活性化するオートアクチベーション活性を示したので、

SOG1 タンパク質を断片化してbait cloneに組み込んだ。その結果、SOG1 のC末に転写活性化ドメインがあることが明らかになったので、Yeast-two-hybridにはそのC末端を除いた断片を組み込んだbait vectorを用いて行った。Preyベクターに組み込まれたライブラリーとしてはシロイヌナズナの 1500 個の転写因子を一つ一つクローン化して混ぜられた転写因子ライブラリーを用いた。そのライブラリーを用いた結果、TIFY2AやMUG13.2 といった転写因子がSOG1 と相互作用している候補遺伝子であることが明らかになった。これらの転写因子の機能については、まだ詳細な解析が行われていない。よってこれらの転写因子が植物体内においてもSOG1 と相互作用しているのか、またDNAダメージのレスポンス反応にどのように関与しているのかを明らかにするのは今後興味深い点である。

4) SOG1 タンパク質修飾の解析

SOG1 タンパク質がDNAダメージに応答して修飾を受ける可能性を調べるために、ガンマ線照射した植物体と照射していない植物体からタンパク質を抽出し、SOG1 タンパク質の挙動を比較した。SOG1 タンパク質を容易に検出するためにSOG1-10xmycコンストラクトを導入した植物体を用いてmyc抗体でSOG1 を検出した。ウェスタンブロットによって、SOG1 を検出したところ、ガンマ線を照射した植物体のSOG1 バンドはコントロールのSOG1 バンドよりも上にシフトしていた。よってSOG1 タンパク質はDNAダメージに応答して何らかの翻訳後修飾を受けている事が明らかになった。今後はこの修飾がリン酸化なのか、あるいはそれ以外の修飾なのかを脱リン酸化酵素を作用させる事で検討する事を予定している。またSOG1 がDNAダメージに応答して修飾されていることが明らかになれば、その修飾がDNAダメージチェックポイントの機能にどのように機能しているのか、またDNAダメージによる修飾が起こらなくなるような変異型SOG1 をもった植物体ではガンマ線照射した植物体にどのような表現系の変化が現れるのかを調べる事も今後の課題として大変興味深い。

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)

[学会発表] (計7件)

- (1) 愿山 郁, Anne Britt, 真木寿治, 梅田正明, 植物のDNAチェックポイント機構は動物とは異なるのか?, 第52回

日本植物生理学会年会, 2011.3. 21 宮城県 仙台市 (地震の影響で中止)

- (2) 愿山 郁, 真木寿治, Anne Britt, 梅田正明, 放射線照射に応答した植物のDNAダメージチェックポイント機構, 日本放射線影響学会第53回大会, 2010. 10. 20, 京都府 京都市
- (3) Kaoru YOSHIYAMA, Anne BRITT, Hisaji MAKI, Masaaki UMEDA, The role of SOG1, a novel transcription factor, in the DNA checkpoint, IGDB International Workshop-2010, 2010. 10. 7. CHINA Beijing
- (4) 愿山 郁, Anne Britt, 真木寿治, 梅田正明, 放射線照射に応答した植物のDNA損傷チェックポイント機構, 日本遺伝学会第82回大会, 2010.9. 20, 北海道 札幌市
- (5) 愿山 郁, Anne Britt, 真木寿治, 梅田正明, 植物のDNAチェックポイント機構で働く新規転写因子SOG1の役割, 日本植物学会第74回大会, 2010. 9. 10, 愛知県 春日井市
- (6) 愿山 郁, Anne Britt, 真木寿治, 梅田正明, 植物が独自に獲得したDNAチェックポイント機構の解明ー新規転写因子SOG1を中心にした解析, 第51回日本植物生理学会年会, 2010. 3.19, 熊本県 熊本市
- (7) Kaoru YOSHIYAMA, Anne BRITT, Hisaji MAKI, Masaaki UMEDA, The role of SOG1, a novel transcription factor, in the DNA checkpoint, Plant DNA Repair and Recombination 2010, 2010. 3. 3, USA, California

6. 研究組織

(1)研究代表者

愿山 郁 (YOSHIYAMA KAORU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号: 10346322