

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05330

研究課題名(和文)植物の根端メリステムに対する有害金属毒性としてのDNA損傷の検証

研究課題名(英文)Possible involvement of DNA damage in root responses to toxic metals

研究代表者

浦口 晋平(Uraguchi, Shimpei)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：20638837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物の根端メリステム(分裂組織)が土壤に起因する有害金属ストレスに対する応答機構をDNA損傷の視点から理解することを目的として実施された。モデル植物のシロイヌナズナを用いた実験により、(1)新奇DNA損傷定量法を開発し、有害金属ストレスによるDNA損傷作用を遺伝子座特異的に検出し、(2)変異株を用いた分子遺伝学的な解析によって有害金属ストレスに対するDNA損傷応答機構の役割を明らかとした。いずれの検討からも、金属種や化学形態によって毒性のメカニズムやターゲットが異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壤中の有害金属は、植物の根の成長や発達を阻害する要因である。有害金属を含む不良土壤でも「植物の健康」が維持されれば、農作物・バイオマス植物の生産性は向上し、世界が直面する気候変動・食料不足の解決にも直結できる。そのためには植物の有害金属耐性を理解する必要がある。本研究は、根の中でも根端分裂組織(メリステム)の細胞群が有害金属の種類によって少なくとも部分的に異なる機序によって阻害作用を受けること、その要因の1つとしてDNA損傷の可能性を示した。本研究の成果は、有害金属ストレスに負けない植物バイオマス生産技術の開発の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to understand the mechanisms of plant root apical meristems responses to toxic metal stress, focusing on DNA damage responses. A plant model *Arabidopsis thaliana* was used for the study. We first developed a novel DNA damage quantification method which is based on real-time PCR, to detect locus-specific DNA damage and characterized DNA damage profiles caused by different toxic metal stresses. Second, we conducted molecular genetic analysis of *Arabidopsis* mutant lines and clarified physiological and morphological responses unique to each metal species tested. A group of NAC-type transcription factors is suggested to mediate root responses elicited by each metal species.

研究分野：植物栄養学

キーワード：有害金属 根端メリステム DNA損傷 NAC型転写因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界では、地質学的な要因および人為的な影響の結果、有害金属による土壌汚染が報告されている。土壌の金属汚染は、金属が分解されないために残留性が高く、土壌中から金属が植物に移行して植物可食部に蓄積するため、日常的に摂食する人にとっての健康リスクとなる。また、土壌中の有害金属は植物の成長も阻害するため、農業・バイオマス生産も悪影響を受ける。植物の有害金属応答のメカニズムを解明することは、このような食の安全性・生産性の問題の解決にとって重要な基盤である。とくに根は、土壌と直接コンタクトする器官であるため、土壌中の有害金属に対する植物の応答を理解する上で、根をターゲットとした解析が重要である。

モデル植物のシロイヌナズナを用いたこれまでの我々の研究の結果から、カドミウム、ヒ素(亜ヒ酸)、水銀(無機水銀、フェニル水銀)は、いずれも根の伸長を阻害し、植物細胞内での解毒にはシステイン含有ペプチド・ファイトケラチンが重要な役割を果たすことを報告している。さらに、金属ストレスによって損傷を受けた根の形態や応答、さらに細胞周期やDNA損傷に関連した遺伝子発現応答には、金属種や化学形態による特異性があることを示唆してきた。

また、植物のDNA損傷応答については、他のグループによってプレオマイシンやゼオシンに代表されるDNA損傷剤を用いた解析によってSOG1と呼ばれるNAC型転写因子を中心とした分子機構の解明が進められていたが、研究開始時点では、金属ストレスとの関連性については不明な点が多い状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナの根に着目し、有害金属の毒性の特異性と根の応答機構について、理解を深めることを目的として実施された。とくに、DNA損傷応答のマスター制御因子であるSOG1とその下流の転写因子ANAC044、ANAC085に着目した検討を行った。SOG1は、DNA損傷のセンサー分子であるATM、ATRの下流に位置し、DNA損傷剤ストレスに応答して相同組換えによるDNA損傷修復機構や、ANAC044、ANAC085を含む細胞周期の抑制機構等を誘導する重要な制御因子であることが報告されている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 有害金属ストレスの特異性のさらなる解析

野生型Col-0およびAtPCS1の機能欠損変異株で有害金属に感受性を示す*cad1-3*を用いて、有害金属ストレスに対する根の伸長応答、根端分裂組織の形態、遺伝子発現応答を解析した。

#### (2) リアルタイムPCRを用いたシロイヌナズナのDNA損傷定量法の開発

長鎖のリアルタイムPCRをベースとしたDNA損傷の定量法を改良し、シロイヌナズナの核およびミトコンドリアDNA損傷を検出する方法を確立した。実験には、野生型Col-0およびSOG1の機能欠損変異株*sog1-101*を用いて、シスプラチンやカンプトテシンなど作用機序の異なるDNA損傷剤で処理した根からDNAを抽出してサンプルとした。

#### (3) 有害金属ストレスが根端のDNA損傷に及ぼす影響の検討

野生型Col-0およびAtPCS1の機能欠損変異株で有害金属に感受性を示す*cad1-3*の根からDNAを抽出してサンプルとした。前項で確立したDNA損傷定量法を用いて、核DNAおよびミトコンドリアDNAの損傷レベルを定量した。

#### (4) 根の有害金属応答におけるSOG1、ANAC044、ANAC085の関与

根の有害金属応答におけるSOG1、ANAC044、ANAC085の関与を検討するため、有害金属ストレス下における変異株の表現型を解析した。野生型Col-0およびSOG1機能欠損変異株*sog1-101*、ANAC044とANAC085の二重欠損変異株*anac044/anac085*、SOG1とANAC044、ANAC085の三重変異株*sog1-101/anac044/anac085*を用いて、亜ヒ酸、カドミウム、無機水銀、フェニル水銀に対する根の応答、根端の形態などを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 有害金属ストレスの特異性のさらなる解析

有害金属ストレスが植物の根端分裂組織の機能に及ぼす影響の元素特異性を明らかにするため、*cad1-3*の根端をモデルに組織や細胞の形態、死細胞の発生について顕微鏡で観察を実施した。亜ヒ酸ストレスでは根端の分裂組織中の維管束部でPI陽性の死細胞を特異的に観察した。亜ヒ酸による根の伸長の停止作用は可逆的で、亜ヒ酸ストレスの解除により根伸長は再開された。伸長の再開に伴い、維管束の死細胞も経時的に解消された。一方、カドミウムでは根端分裂組織の移行領域周辺にダメージを生じ、カドミウムストレスを解除してもダメージからの回復

は観察されなかった。ANAC044 や ANAC085 を含む遺伝子発現解析の結果も、亜ヒ酸とカドミウムストレスの特異性を示唆し、それぞれのストレスに特異的な分子応答が認められた。

また、以前より検討していたフェニル水銀と無機水銀の毒性の特異性について解析を進め、どちらもファイトケラチンを介した無毒化機構 (AtPCS1 や ABCC1・ABCC2) が重要な役割を果たすものの、ストレスを受けた根の形態は異なり、栄養元素のホメオスタシスに及ぼす影響にも特異性があることを明らかとした。水銀に関する成果は、Plant Molecular Biology 誌に発表した (Uraguchi *et al.*, 2022)。また、ファイトケラチンと金属の結合性を評価する新規ビーズアッセイ法について解析を進め、ファイトケラチンと結合金属の相互作用と金属特異性について Metallomics 誌に報告した (Uraguchi *et al.*, 2021)。

#### (2) リアルタイム PCR を用いたシロイヌナズナの DNA 損傷定量法の開発

DNA 損傷を評価する標準的な手法としてコメットアッセイが挙げられるが、根から抽出した核を用いた場合は、定量性という点で技術的な難しさがある。また、核 DNA とミトコンドリア DNA を区別できない点も課題である。これらの問題を解決できる方法として、数 kb に及ぶ長鎖をターゲットとしたリアルタイム PCR を用いた遺伝子座特異的な DNA 損傷の定量法が提唱されている (下図)。本研究では、まず、PCR プロトコルを改良し、2 kb 程度の DNA 断片の増幅効率を高めてリアルタイム PCR としての定量性を通常の短鎖 PCR と同程度にまで向上させた。PCR マーカーとしてシロイヌナズナの核 DNA について 5 つの遺伝子座と 3 つのミトコンドリア遺伝子座を確立した。DNA 損傷剤のモデルとして二本鎖切断を誘導するシスプラチンで短期処理した根から抽出した DNA を解析したところ、相同組換え修復を誘導できない *sog1-101* 変異株では、核およびミトコンドリア DNA の両方で Col-0 よりも顕著に多くの DNA 損傷が検出された。その他の DNA 損傷剤を用いた検討でも、DNA 損傷が検出され、用量依存性や経時的な変化の解析にも応用可能であることが示された。

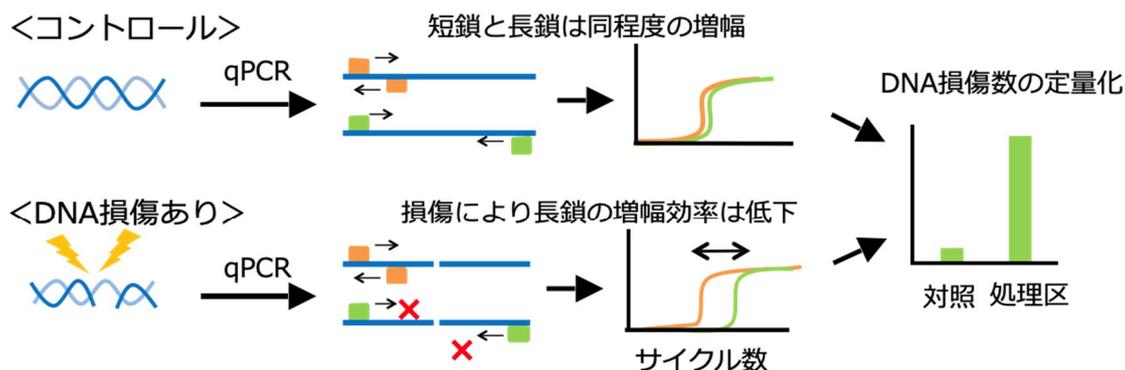


図 リアルタイムPCRを用いたDNA損傷の定量法の概念

#### (3) 有害金属ストレスが根端の DNA 損傷に及ぼす影響の検討

有害金属ストレスが植物の根端において誘発する DNA 損傷の金属特異性を明らかとするため、前項で確立したリアルタイム PCR による DNA 損傷評価系を用いて検討した。シロイヌナズナの野生型 Col-0 および有害金属感受性の変異株 *cad1-3* の根端における DNA 損傷レベルを様々な有害金属ストレス条件下で評価した。*cad1-3* では項目 (1) で示したように有害金属ストレスに感受性を示し、根の応答や形態も異なることから、金属や化学形態特異的な毒性を反映しやすいモデルであると考えた。亜ヒ酸、カドミウム、無機水銀、フェニル水銀はいずれも DNA 損傷を誘発したが、野生型と *cad1-3* の違いは予測とは異なり明確ではなかった。*cad1-3* ではファイトケラチン合成機能が欠損しているため、植物体としては感受性を示すものの、DNA 損傷修復機構は機能しているため、DNA 損傷レベルとしては野生型との差や金属間の違いを検出できなかった可能性が考えられた。

そこで、シロイヌナズナの DNA 損傷応答のマスター制御因子である SOG1 欠損変異株 *sog1-101* における有害金属ストレス下での DNA 損傷を定量した。*sog1-101* 変異株では相同組換えによる DNA 損傷の修復がほとんど誘導されない。結果、DNA 損傷のレベルについて *sog1-101* と野生型との間に明確な差は認められなかった。相同組換え経路以外の DNA 修復経路についても検証が必要であるとともに、*sog1-101/cad1-3* 二重変異株を作成して検討する必要がある。

#### (4) 根の有害金属応答における SOG1, ANAC044, ANAC085 の関与

亜ヒ酸、カドミウム、無機水銀に対する SOG1, ANAC044, ANAC085 の変異株の根の応答を経時的に解析した。カドミウム培地では ANAC044 と ANAC085 の変異によって根の伸長が野生型よりも促進された。亜ヒ酸と無機水銀では ANAC044 と ANAC085 に加えて SOG1 の変異によって根の伸長が野生型よりも大きくなった。PI 染色によって根端分裂組織の形態を観察し、組織サイズを画像解析によって定量したところ、根の伸長解析の結果を支持し、変異株ではそれぞれ

れの金属ストレスにおいて分裂組織のサイズが野生型よりも大きかった。形態としては、*cad1-3* で観察されたような異常な形態や目立ったダメージは認められなかった。ただし、カドミウム処理において、SOG1 や ANAC 変異株では静止中心の周辺において死細胞が野生型よりも高頻度で観察された。以上の結果より、SOG1 モジュールは有害金属ストレス応答において、DNA 損傷の修復誘導よりも、根端の細胞周期を抑制し、根伸長を負に制御する役割が大きいことが示唆された。また、カドミウムでは変異株において死細胞が多く検出されたことから、細胞周期の抑制と損傷修復は連動しており、有害金属ストレスに応答した根の伸長制御の複雑さや金属特異性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uraguchi Shimpei, Ohshiro Yuka, Otsuka Yuto, Wada Emiko, Naruse Fumii, Sugaya Kakeru, Nagai Kenichiro, Wongkaew Arunee, Nakamura Ryosuke, Takanezawa Yasukazu, Clemens Stephan, Ohkama-Ohtsu Naoko, Kiyono Masako	4. 巻 109
2. 論文標題 Phytochelatins-mediated metal detoxification pathway is crucial for an organomercurial phenylmercury tolerance in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 563-577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-021-01221-0	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 該当する

1. 著者名 Uraguchi Shimpei, Nagai Kenichiro, Naruse Fumii, Otsuka Yuto, Ohshiro Yuka, Nakamura Ryosuke, Takanezawa Yasukazu, Kiyono Masako	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of affinity bead-based <i>in vitro</i> metal-ligand binding assay reveals dominant cadmium affinity of thiol-rich small peptides phytochelatin beyond glutathione	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 mfab068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mtomcs/mfab068	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11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤正和, 浦口晋平, 萬代麻衣, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 亜ヒ酸とカドミウム毒性に対するシロイヌナズナ根端分裂組織の応答の特異性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2023年度愛媛大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦口晋平, 山村有加, 菅谷翔, 佐藤正和, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 根端分裂組織のカドミウム・亜ヒ酸応答におけるNAC型転写因子ANAC044とANAC085の機能分化の可能性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2023年度愛媛大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦口晋平, 佐藤正和, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 植物の根端をモデルとした亜ヒ酸応答・毒性の特異性の解析
3. 学会等名 第28回ヒ素シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦口晋平, 山村有加, 菅谷翔, 佐藤正和, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 根端分裂組織のカドミウム応答および亜ヒ酸応答におけるSOG1, ANAC044, ANAC085の役割の特異性
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 浦口晋平, 齋藤光莉, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 シロイヌナズナの亜ヒ酸・カドミウム応答におけるオーキシンの異なる役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 浦口晋平, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 モデル植物の根端が切り拓く有害金属毒性の新展開
3. 学会等名 生命金属科学シンポジウム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤正和, 浦口晋平, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 シロイヌナズナの根端分裂組織に対する有害元素毒性の特異性の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦口晋平, 小田切美優, 小川琴未, 羽貝知洸, 平川桃子, 齋藤光莉, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 根端分裂組織に対する有害元素毒性の特異性とオーキシンの関係性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦口晋平, 轟里紗, 佐藤正和, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 リアルタイムPCRを用いたDNA損傷定量法QuBAREYによる根端の有害金属ストレス応答の解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦口晋平, 鈴木真帆, 田丸夏帆, 轟里紗, 佐藤正和, 大城有香, 中村亮介, 高根沢康一, 清野正子
2. 発表標題 リアルタイムPCRを用いたDNA損傷定量法QuBAREYによるsog1-101のDNA損傷応答の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会講演要旨集
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦口晋平,菅谷 翔,小川琴未,大城有香,中村亮介,高根沢康一,清野正子
2. 発表標題 根端分裂組織の有害元素応答におけるSOG1, ANAC044, ANAC085の役割
3. 学会等名 日本土壤肥料学会講演要旨集第67集
4. 発表年 2021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
---------	---------