

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570055

研究課題名（和文） 高等植物の細胞周期チェックポイントに関わる新規蛋白質の探索

研究課題名（英文） Screening of novel checkpoint-related proteins in higher plants

研究代表者

坂本 綾子（SAKAMOTO 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・研究主幹

研究者番号：00354960

研究成果の概要（和文）：

高等植物におけるチェックポイント機構の全容を明らかにする目的で、DNA 損傷や複製障害を受けたときに特異的にリン酸化される蛋白質を解析し、チェックポイントの制御に関与すると思われるいくつかの新規蛋白質の候補を得た。また、チェックポイント応答の下流で起こる損傷乗り越え複製について解析し、特異的なポリメラーゼが突然変異を誘発したり、相同組み換えを制御することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the molecular mechanism of cell-cycle checkpoint in higher plants, we analyzed the proteins that are specifically phosphorylated after DNA damage or replication inhibition, and found several candidates for checkpoint proteins. We also analyzed the function of TLS-type DNA polymerases that are thought to work downstream of the checkpoint response, and found that some polymerases induce mutations and regulate somatic recombination activities

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

細胞周期チェックポイントとは、DNA 複製の中断や染色体の分配異常などといった異常事態に際して細胞周期の進行を停止し、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。高等植物では、PIKK ドメインを持つ AtATM 及び AtATR がシロイヌナズナから単離され、DNA 損傷や複製障害に際して両者が協調的に働いて細胞周期の停止を引き起こすことがわかっている。一方で CDK/Cyclin 複合体は、その生合成や複合体形成、リン酸化/脱リン酸化反応、分解などによって細胞

周期の進行をコントロールしていることが知られている。しかし、AtATM/AtATR と CDK/Cyclin 複合体の間に位置する CHK に相当する蛋白質はまだ1つも発見されていない。これに加え、DNA 損傷や複製障害等の異常を直接感知し、AtATM や AtATR を活性化させる蛋白質もまだ同定されていない。このため、チェックポイント機構の大部分はブラックボックスのままになっている。

2. 研究の目的

チェックポイント機構は、真核生物で広く保存されており、高等植物のゲノム安定性を維持する上で重要な役割を担うことが予想されている。しかし、上述のように、植物のチェックポイント反応には未知の部分が多く、どういった分子が関与しているのか、どのようにしてシグナルが伝えられるのか、全くわかっていない。

一方で、申請者らは紫外線感受性変異株の解析から AtATR と相互作用する蛋白質 AtATRIP を発見し、この蛋白質が DNA 損傷や複製障害に際したチェックポイント反応に必須であることを示して来ている。AtATRIP には PIKK のターゲット配列が存在することから、AtATM や AtATR によってリン酸化されることによってチェックポイントシグナルの伝達に関与することが示唆されている。

そこで、本研究では、AtATRIP との蛋白質間相互作用や、AtATRIP を基質として細胞のキナーゼ活性を解析することにより、チェックポイント応答に関わる新規蛋白質を探索し、それらを解析することによりブラックボックスを解消し、チェックポイント機構の全体像を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AtATRIP 蛋白質を基質として用いたキナーゼ活性の検出

AtATRIP には PIKK のターゲット配列が存在し、大腸菌中で発現させた AtATRIP 蛋白質に対してシロイヌナズナ核蛋白質画分を作用させるとリン酸化が起こることがわかっている。そこで、AtATRIP 蛋白質を基質として、チェックポイント活性化処理を行った植物の抽出物を反応させ、細胞のキナーゼ活性の変化を解析する。

(2) チェックポイント特異的にリン酸化される蛋白質の解析

PIKK の下流に位置するキナーゼは放射線や複製阻害剤により活性が誘導されることが予想される。そこで、ガンマ線や紫外線で処理した植物や培養細胞などから蛋白質を抽出し、リン酸化蛋白質に対するアフィニティーカラムを用いて精製し、2次元電気泳動等で解析を行う。ここから特異的に生じたス

ポットを解析することにより、PIKK のターゲットとなる蛋白質の候補を探索する。

(3) データベースに基づく AtATM/AtATR のターゲット蛋白質の探索

動物や酵母においては、AtM/ATR のリン酸化のターゲット配列は SQ/TQ 配列であることがわかっている。そこで、シロイヌナズナ遺伝子データベースの中から、チェックポイントに関連し、SQ/TQ 配列をもつ蛋白質遺伝子を探索し、チェックポイントシグナルの伝達に関与することが予想される遺伝子の候補を得る。

(4) チェックポイント関連蛋白質間の相互作用の解析

動物や酵母においては、DNA 複製が何らかの原因で阻害されて一本鎖 DNA が生じると、そこに ATRIP を含む高次蛋白質複合体が形成され、これが ATR を活性化することがわかっている。そこで、AtATRIP 遺伝子、およびチェックポイント反応において蛋白質複合体形成に関与することが予想される蛋白質の遺伝子を酵母細胞に導入し、two hybrid の実験系を用いて両者の間で相互作用が見られるかどうか解析する。さらに、両遺伝子大腸菌中で産生させ、*in vitro*における相互作用を解析する。

(5) プルダウンアッセイによるチェックポイント関連蛋白質の探索

動物や酵母においては、DNA 複製が何らかの原因で阻害されて一本鎖 DNA が生じると、そこに ATRIP を含む高次蛋白質複合体が形成され、これが ATR を活性化することがわかっている。そこで、GFP タグをつけたチェックポイント関連遺伝子をシロイヌナズナに導入し、チェックポイント反応を活性化させた細胞から抗 GFP 抗体を用いて高次蛋白質複合体を回収し、チェックポイント反応に関与する新規蛋白質を探索する。

(6) チェックポイントと DNA 複製のクロストークの解析

DNA 損傷や何らかの理由で複製阻害が起こると、DNA 複製複合体が解体して損傷乗り越え複製や鋳型の交換などが起こることが知られている。これらの反応により、突然変異や相同組換えの上昇が見られることが予想される。そこで、それぞれのマーカーを導入した植物に紫外線または放射線を照射してチェックポイントを誘導し、突然変異や相同組換えの頻度がどう変化するのか、またどのような遺伝子が関与しているのかを解析する。

4. 研究成果

(1) AtATRIP 蛋白質を基質として用いたキナーゼ活性の検出

大腸菌で産生させた AtATRIP を基質として用い、DNA 損傷処理によってリン酸化活性が変化するかどうかを解析した。その結果、ガンマ線処理を行った植物から抽出した蛋白質画分を用いると、未処理の植物由来の蛋白質画分に比べてリン酸化活性が上昇した。このことから、シロイヌナズナのリン酸化活性はチェックポイントの活性化にもなって誘導されることが示唆された。

(2) ガンマ線照射によって特異的にリン酸化される蛋白質の探索および同定

ガンマ線処理を行ったシロイヌナズナから蛋白質画分を抽出し、リン酸化蛋白質に特異的な蛍光試薬(ProQ diamond)で染色を行った。ガンマ線処理によって特異的にリン酸化されたスポットを抽出してトリプシンで処理し、PMF 解析を行った。その結果、RuBisCO 等のいくつかの蛋白質がガンマ線照射によって特異的にリン酸化されることが明らかになった。

(3) 紫外線照射によって特異的にリン酸化される蛋白質の探索および同定

紫外線を照射した植物から総蛋白質を抽出し、リン酸化蛋白質画分を濃縮した上で2次元電気泳動で分画し、ProQ diamond によってリン酸化蛋白質の検出を行った。得られた蛋白質のスポットをトリプシン処理後に PMF 分析にかけた結果、熱ショック蛋白質(HSP)90 等のいくつかの蛋白質が紫外線照射によって特異的にリン酸化されることが明らかになった。

(4) データベースに基づく AtATM/AtATR のターゲット蛋白質の探索

シロイヌナズナ遺伝子データベースのなかから、チェックポイントに関連し、かつ SQ/TQ 配列を含む遺伝子を探索したところ、Rad9、RPA、TopBP1 等のホモログを含む多数の蛋白質が AtATM/AtATR のターゲットの候補として見出された(図1)。

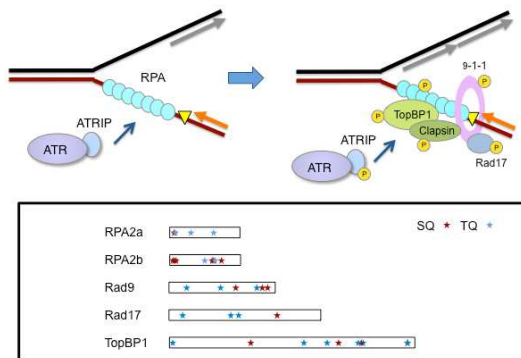


図1 AtATR複合体の活性化とリン酸化のターゲット

(5) チェックポイント関連蛋白質間の相互作用の解析

チェックポイント応答で働く AtATRIP 蛋白質と、AtATM/AtATR のターゲット蛋白質の候補である AtRPA2 蛋白質との相互作用を解析するため、AtATRIP および AtRPA2 遺伝子を two hybrid 実験用ベクターに組み込み、相互作用を解析した。その結果、これらは酵母細胞中で相互作用することが示された(図2)。

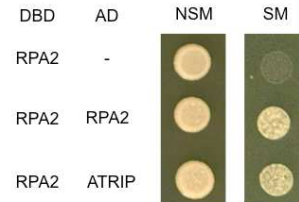


図2 AtRPA2とAtATRIPとの相互作用

さらに、大腸菌中で発現させた AtATRIP の N 末領域と Halo-RPA2 との *in vitro* での相互作用を解析した結果、AtATRIP の N 末領域と AtRPA2 が *in vitro* で相互作用することが明らかになった。

(6) AtRPA2 欠損植物の表現型の解析

DNA 複製とチェックポイント応答に関わる AtRPA2 遺伝子の機能を調べるため、この遺伝子が破壊された *rpa2-1*(T-DNA 挿入変異体) および *rpa2-2*(イオンビーム誘発変異体) の解析を行った。その結果、*rpa2-1* 植物は矮性となり、ほとんどが稔性みられないことがわかった。一方で、*rpa2-2* 植物はやや矮性となるものの稔性は保持されており、弱い allele であることがわかった。

(7) タグを付けた AtRPA2 遺伝子のシロイヌナズナへの導入とプルダウン実験

チェックポイント応答で働く AtATRIP 蛋白質と相互作用する RPA2 蛋白質と GFP との融合蛋白質をシロイヌナズナで発現させた。その結果、GFP-RPA2 融合遺伝子は、RPA2 の欠損に由来する表現型(矮性)を相補することが明らかになった。また、GFP をタグとして精製を試みた結果、GFP-RPA2 の精製に成功した。さらに、いくつかのマイナーなバンドが検出され、これらが AtRPA2 と相互作用する新規蛋白質である可能性が示唆された。

(8) チェックポイントと DNA 複製のクロストークの解析

DNA 損傷時に働く損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼとチェックポイント機構との関係を調べる目的で、紫外線および放射線で処理した植物における突然変異頻度の計測を行った。その結果 AtREV3、AtREV1 または AtPOLH を欠失すると損傷突然変異頻度の上昇また

は低下が見られ、乗り越え型ポリメラーゼが紫外線や放射線処理された植物における DNA 複製に関与していることが明らかになった (図 3)。

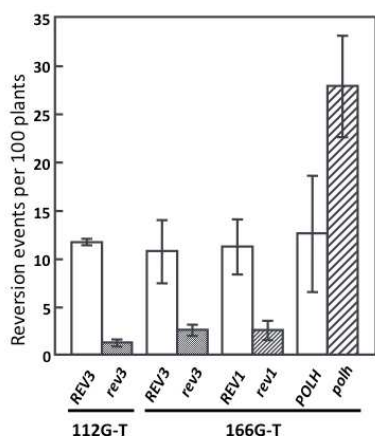


図 3 紫外線照射後の突然変異誘発頻度

さらに、AtREV3 および AtREV1 を欠失した植物における相同組換え活性を調べたところ、野生型植物との間で組換え頻度に差が見られ、損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼが相同組換え活性の制御において何らかの機能を持つことが示唆された。

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)

① R. Yoshihara, S. Nozawa, Y. Hase, I. Narumi, J. Hidema and A. N. Sakamoto. Mutational effects of γ -rays and carbon ion beams in Arabidopsis seedlings. J. Radiat. Res., in press. 査読あり
doi: 10.1093/jrr/rrt007

② M. Nakagawa, S. Takahashi, I. Narumi and A. N. Sakamoto. Role of AtPol ζ , AtRev1 and AtPol η in γ ray-induced mutagenesis. Plant Signal Behav. 6, 728-31. (2011) 査読あり

③ M. Nakagawa, S. Takahashi, A. Tanaka, I. Narumi and A. N. Sakamoto. Role of AtPol ζ , AtRev1, and AtPol η in UV light-induced mutagenesis in Arabidopsis. Plant Physiol. 155, 414-20. (2011) 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

① 坂本綾子、高橋真哉、Wojciech Strzalka、鳴海一成「ゲノム安定性維持における AtRev1 の様々な機能」平成 24 年 3 月 21 ~ 22 日、第 54 回日本植物生理学会年会 (岡

山市)

② R. Yoshihara, Y. Hase, S. Nozawa, I. Narumi, K. Takimoto and A. N. Sakamoto. Mutation Spectrum Analysis in Higher Plant. EMBO Workshop "Genetic Stability and Change: Genome Maintenance Mechanisms in Plants" 2-5 May, 2012, Roscoff, France

③ 吉原亮平、長谷 純宏、野澤樹、鳴海一成、滝本晃一、日出間純、坂本綾子「放射線誘発 DNA 酸化損傷がシロイヌナズナにおける突然変異に与える影響」平成 23 年 11 月 17 日 ~ 18 日 日本放射線影響学会第 54 回大会 (神戸市)

④ 日出間純、寺西美佳、土岐精一、雑賀啓明、坂本綾子、吉原亮平「量子ビーム変異誘発機構の解明：高効率な育種素材創成を目指して」平成 23 年 10 月 14 日 第 6 回高崎量子応用研究シンポジウム (高崎市)

⑤ 吉原亮平、滝本晃一、長谷純宏、野澤樹、坂本綾子、鳴海一成「変異誘発効果から見る紫外線および電離放射線の高等植物に対する影響-シロイヌナズナを用いた突然変異スペクトル解析-」平成 22 年 10 月 20 日 ~ 22 日 日本放射線影響学会第 53 回大会 (京都市)

⑥ 坂本綾子「シロイヌナズナの細胞周期チェックポイントに関与する AtATRIP の解析」、平成 22 年 9 月 10 日 日本植物学会第 74 回大会 (春日井市)

[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

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・研究主幹

研究者番号：00354960