

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870026

研究課題名(和文)植物におけるコンデンシンを含むDNA損傷応答モデルの確立

研究課題名(英文)Characterization of condensin-mediated DNA damage response in plants

研究代表者

坂本 卓也 (Sakamoto, Takuya)

東京理科大学・理工学部・ポスドクトラル研究員

研究者番号：40637691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、植物の染色体タンパク質複合体であるコンデンシンIIにDNA損傷を緩和する作用があることが分かっている。本研究では、コンデンシンIIがどのようにしてDNA損傷の緩和に作用するのかを明らかにすることを目的とした。解析の結果、コンデンシンIIはDNA損傷修復には関わっていない可能性が高いこと、そして、コンデンシンIIにクロマチンを凝縮させる作用があることを発見した。このことから、コンデンシンIIには、クロマチンの凝縮を通じて物理的にDNA損傷を引き起こす因子からDNAを守る作用があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A plant chromosomal protein complex, condensin II, is known to function in alleviating DNA damage. However, it is still unclear that how condensin II acts in DNA damage response. To reveal the detailed function of condensin II in the alleviation of DNA damage, we characterized Arabidopsis condensin II mutants. As a result, it was found that Arabidopsis condensin II is unlikely to be required for the DNA damage repair but functions in the high compaction of genome-wide chromatin. These findings indicate that Arabidopsis condensin II is considered to physically protect DNA through the high compaction of chromatin.

研究分野：植物分子生理学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ コンデンシンII 染色体配置

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 損傷応答における Cnd の役割

コンデンシン(以下 Cnd と略す)は真核生物に広く保存された染色体構造維持に重要な役割を果たすタンパク質複合体である。この複合体は2つのコアタンパク質及び3つの制御タンパク質で構成され、異なる制御サブユニットの組み合わせを持つ2種類の Cnd、タイプ I (Cnd I) 及びタイプ II (Cnd II) を有する(図1)。Cnd の広く知られる機能としては、染色体凝集と乖離があげられるが、それ以外にも動物培養細胞を用いた実験から、Cnd II が相同組換えの足場となることで DNA 損傷修復に参与することが示されている。植物においては、申請者がこれまでに、シロイヌナズナ Cnd II が DNA 損傷の緩和を通じてホウ素過剰ストレス耐性に寄与することを明らかにした。しかし、植物 Cnd II がどのような作用機序で DNA 損傷緩和に寄与するかは不明なままである。

(2) Cnd の活性制御機構

Cnd は DNA の supercoiling 活性を持つ。ヒトの Cnd では、この活性や染色体への局在が、種々の分裂期キナーゼやホスファターゼによって分裂期特異的に制御される。近年、ヒト培養細胞において、分裂期キナーゼの一つ、オーロラキナーゼ(AUR)は Cnd I をリン酸化することで分裂期後期の染色体動態制御をするが、Cnd II をリン酸化しないことが示された。一方で、DNA 損傷応答が起こる間期における Cnd の制御機構については不明である。植物間期核において Cnd II 及び AUR は共に核に局在することから、申請者が生物情報学的解析を行ったところ、植物 Cnd II のサブユニット CAP-H2 でのみ保存される AUR リン酸化候補サイトをいくつか発見した(図2)。また、申請者はこれまでに、AUR3 の RNAi 株が Cnd II 変異株よりもより DNA 損傷感受性であることを見出している。以上のことは、間期の DNA 損傷応答において、Cnd II が AUR3 による制御をうけて機能する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

(1) DNA 損傷応答における植物 Cnd II の作用機序の解明

植物の Cnd II はホウ素過剰や UV によってもたらされる DNA 損傷の緩和に寄与することが明らかとなっている。Cnd II の DNA 損傷緩和の作用機序を明らかにすることは、植物がどのようにして環境ストレスに対応するかを知る上で重要な知見となると予測される。そこで、本研究では、これまでの多生物種における Cnd II の知見から導いた以下の仮説に基づいて Cnd II の作用機序の解明に迫ることを目的とした。

上述した動物細胞の場合同様に、Cnd II は DNA 損傷修復を促進する作用がある。

クロマチンの高度な凝集により、Cnd II は DNA 損傷の原因物質(反応)から DNA を物理的に防御する。

(2) DNA 損傷に応答した植物 Cnd II の制御機構の解明

シロイヌナズナの Cnd II サブユニット CAP-H2 には AUR によるリン酸化認識配列があり、AUR による Cnd II のリン酸化制御の可能性が考えられる。また、AUR3 の機能抑制は DNA 損傷感受性を引き起こすことが明らかとなっている。そこで、Cnd II が AUR3 によってリン酸化されることによって DNA 損傷応答に寄与していると仮説をたて、この検証により、Cnd II の DNA 損傷応答機構を議論する。

3. 研究の方法

(1) DNA 損傷修復への Cnd II の関与の検証

DNA 損傷修復に Cnd II が関与するかどうかを検証するために、野生型株及び Cnd II 変異株 (*cap-h2-2*) を用いて、線照射による DNA 損傷の誘発後の DNA 損傷応答遺伝子の発現変化の解析を行った。DNA 損傷応答に比例して発現量が変化することが知られている遺伝子 BRCA1、RAD51、GR1 を解析に用いた。

(2) クロマチン強度維持への Cnd II の関与の検証

クロマチン構造の安定性を、野生型株及び Cnd II 変異株 (*cap-h2-2*) の実生から抽出したクロマチン DNA の DNase に対する感受性で検証した。クロマチンの弛緩や、構造の不安定性は、クロマチン DNA の DNase に対する感受性を引き起こすと考えられる。また、弛緩したクロマチンの指標となる、ヒストン H3 及び H4 のアセチル化のレベルを、花芽を用いた抗体免疫染色法及び画像解析ソフト ImageJ による解析により比較検証した。さらに、染色体レベルでの凝縮度を、FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法によるゲノム上の特定の2領域の同時可視化により検証した。特定の2領域として、セントロメアと5Sあるいは45S rDNA 領域の組み合わせとした。セントロメアとそれぞれの領域間の位置関係を、ImageJ を用いて解析し、野生型株及び Cnd II 変異株 (*cap-h2-2* 及び *cap-g2-1*) の比較により、染色体レベルでの凝縮への Cnd II の寄与を議論した。

(3) AUR による Cnd II リン酸化の検証

シロイヌナズナゲノムには3つの AUR がコードされており、これまでに AUR1 及び AUR2 は機能重複することが知られている。そこで、大腸菌で発現・精製した Cnd II サブユニット CAP-H2、AUR 及び AUR3 を用いて、*in vitro* リン酸化アッセイを行った。アッセイには、non-R1 でリン酸化を検出できる、ATP S 及び抗チオリン酸化エステル抗体を用いた方法を採用した。また、リン酸化部位を特定するために、*in vitro* で AUR によるリン酸化を

行った CAP-H2 の質量分析を行った。

4. 研究成果

(1) 植物 Cnd II の DNA 損傷緩和作用機序

野生型株 (Col-0) 及び Cnd II 変異株 (*cap-h2-2*) における 100Gy の線照射後 0、6、12 時間後の DNA 損傷応答遺伝子 BRCA1、RAD51、GR1 の発現レベルの経時変化を解析した。その結果、野生型株及び Cnd II 変異株ともに、DNA 損傷誘導直後に上記 3 種の DNA 損傷応答遺伝子の発現レベルの急上昇がみられ、照射後 12 時間でほぼ照射前の発現レベルに戻り、Cnd II を欠損しても、DNA 損傷の修復速度には影響がないことが示された。このことから、シロイヌナズナの Cnd II は DNA 損傷修復には貢献していないであろうと考えられた。

そこで、クロマチンの高度な凝集を介した Cnd II による DNA 損傷の原因物質 (反応) からの DNA の物理的防御の可能性について検証した。実生から抽出したクロマチン DNA の DNase 感受性は、野生型株と比べて、Cnd II 変異株で高いことが分かった。また、クロマチンの弛緩の指標となるヒストン H3 及び H4 のアセチル化の程度が、Cnd II 変異株において野生型株よりも上昇していた (図 1)。以上のことから、シロイヌナズナの Cnd II は、クロマチンの凝集に機能することが示された。

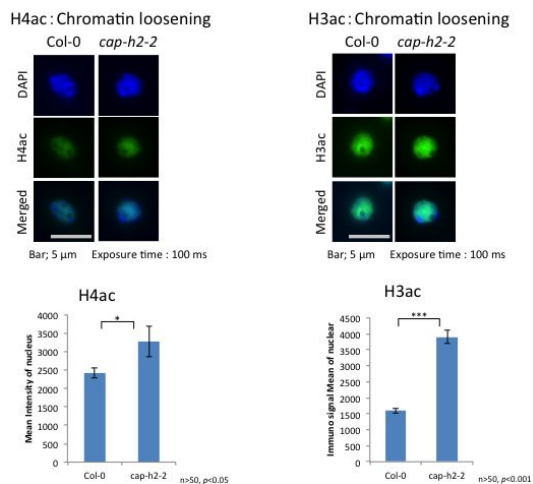


図 1. 抗体免疫染色によるヒストン H3 及び H4 のアセチル化の程度の検出。

上図は、抗ヒストン H3 あるいは H4 アセチル化抗体を用いた代表的な免疫染色画像。

下図は、蛍光の輝度値をもとに、アセチル化の程度を定量化したものである。アセチル化の程度が高ければ高い程、高い輝度値となる。

さらに、FISH 法により、セントロメアと 5S あるいは 45S rDNA 領域間の位置関係を解析したところ、野生型株ではセントロメアの近傍に位置する 5S 及び 45S rDNA 領域が、Cnd II 変異株においては離れて位置することが分かった (図 2)。これらのことから、Cnd II

はクロマチンの高度な凝集を介して、染色体レベルでもその凝集に機能していることが示唆された。

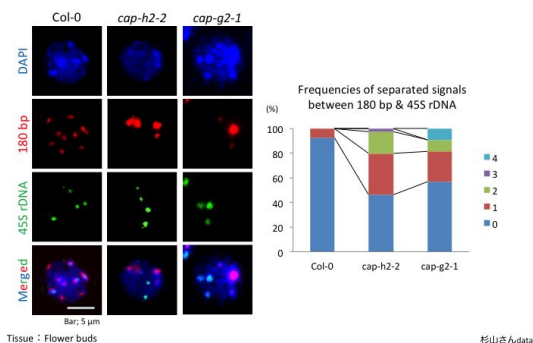


図 2. FISH 法を用いたセントロメア (180bp) 及び 45S rDNA 領域の可視化。

左図は、代表的な FISH 画像。野生型株では、45S rDNA 領域はセントロメアのシグナルに近接しているが、Cnd II 変異株ではセントロメアとは離れた場所に位置する 45S rDNA シグナルが検出される。右図は、セントロメアから離れた場所に位置する 45S rDNA シグナルの検出頻度を定量化したものである。

以上の結果から、シロイヌナズナの Cnd II は、クロマチンの高度な凝集を介して、染色体レベルでの DNA の安定性維持に寄与し、DNA 損傷応答から、DNA を保護する働きがあると推測された。

(2) AUR による植物 Cnd II のリン酸化制御

in vitro リン酸化アッセイを行ったところ、AUR1 及び AUR3 いずれによっても、Cnd II サブユニット CAP-H2 がリン酸化を受けることが示された (図 3)。

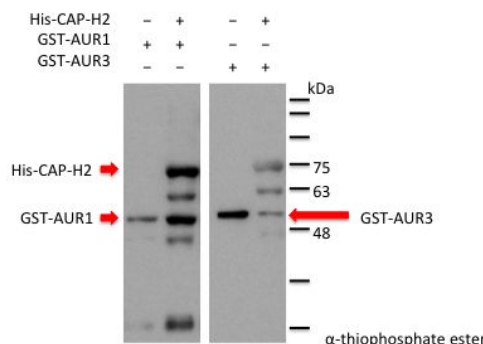


図 3. in vitro リン酸化アッセイによる、AUR による Cnd II サブユニット CAP-H2 のリン酸化の検出。

次に、質量分析により、リン酸化部位の同定を試みた。その結果、12 カ所のリン酸化候補部位が同定された。それぞれの候補部位にあるスレオニンあるいはセリンをアラニンに置換した、変異 CAP-H2 タンパク質を作製

し、AUR によるリン酸化部位の特定を試みたところ、少なくとも2カ所以上のAURによるリン酸化部位の存在が示されたが、完全に部位を特定するには至らなかった。現在、引き続き解析を継続している。

動物細胞では、Cnd II が DNA 損傷からの DNA の保護に寄与しているかどうかは示されていない。また動物細胞の Cnd II サブユニット CAP-H2 は AUR によるリン酸化を受けないことが明らかとなっている。本研究の成果は、植物のみに特異的に保存された Cnd II の機能があることを示唆するものである。

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 2件)

Y. Ohmori, Y. Inui, M. Kajikawa et al., (計41人中11番目) Difference in cesium accumulation among rice cultivars grown in the paddy field in Fukushima Prefecture in 2011 and 2012, *Journal of Plant Research*, 査読有, vol.127, 2013, 57-66.
DOI:10.1007/s10265-013-0616-9

S. Matsunaga, Y. Katagiri, Y. Nagashima, T. Sugiyama, J. Hasegawa, K. Hayashi, T. Sakamoto, *New Insights into the Dynamics of Plant Cell Nuclei*, *International Review of Cell and Molecular Biology*, 査読有, vol.305, 2013, 253-301.
DOI:10.1016/B978-0-12-407695-2.00006-8

[学会発表](計 12件)

坂本卓也、森田明裕、松永幸大、DNA 損傷応答におけるシロイヌナズナオーロラキナーゼの解析、日本植物形態学会第24回大会、2012年9月、姫路

坂本卓也、森田明裕、松永幸大、シロイヌナズナのDNA損傷応答におけるコンデンシンIIの解析、日本植物学会第76回大会、2012年9月、姫路

T. Sakamoto, A. Morita, T. Sugiyama, S. Matsunaga, *Analysis of regulatory mechanism of condensin II in response to DNA damage*, 第54回日本植物生理学会、2013年3月、岡山

T. Sakamoto, N. Sotta, S. Matsunaga, T. Fujiwara, *Isolation and characterization of novel Arabidopsis mutants hypersensitive to excess boron*, *Boron 2013*, 2013年8月、イスタンブール

T. Sakamoto, S. Matsunaga, T. Fujiwara, *Characterization of the roots of Arabidopsis mutant hypersensitive to boron overload stress*, *The International Plant Nutrition Colloquium XVII*, 2013年8月、イスタンブール

坂本卓也、野村有子、中神弘史、松永幸大、オーロラキナーゼによる26SプロテアソームサブユニットRPT5aのリン酸化制御の可能性について、日本植物学会第77回大会、2013年9月、札幌

杉山智哉、坂本卓也、松永幸大、染色体核内配置を制御する因子の発見、日本植物学会第77回大会、2013年9月、札幌

北原英里奈、坂本卓也、伊藤正樹、松永朋子、栗原大輔、松永幸大、オーロラキナーゼの細胞周期のイメージング解析、日本植物学会第77回大会、2013年9月、札幌

坂本卓也、野村有子、中神弘史、松永幸大、シロイヌナズナオーロラキナーゼの新規基質候補因子の解析、日本植物形態学会第25回大会、2013年9月、札幌

杉山智哉、坂本卓也、松永幸大、シロイヌナズナにおける染色体核内配置を制御する因子の解析、日本植物形態学会第25回大会、2013年9月、札幌

北原英里奈、坂本卓也、伊藤正樹、松永朋子、栗原大輔、松永幸大、細胞周期を制御するオーロラキナーゼのイメージング解析、日本植物形態学会第25回大会、2013年9月、札幌

T. Sakamoto, T. Sugiyama, T. Hirakawa, S. Matsunaga, *The Arabidopsis condensin II is required for correct chromosome distribution during interphase*, 第55回日本植物生理学会、2014年3月、富山

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本卓也 (SAKAMOTO, Takuya)

東京理科大学・理工学部・ポストドクトラル研究員

研究者番号：40637691