

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
 大学院生研究
 2003 年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院				理学	研究科	生命理学	専攻
指導教員	所属・職名			氏名				
	生命理学科・助教授			関根 靖彦 印				
自然・人文の別	自然 ・ 人文		個人・共同の別	個人 ・ 共同		2 名		
研究課題	植物オルガネラにおける RecA 相同タンパク質の機能解析							
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年			氏名				
	理学研究科生命理学専攻 博士前期過程 2 年			小田原 真樹 印				
研究組織	在籍研究科・専攻・学年			氏名				
	理学研究科生命理学専攻 博士前期過程 1 年			井上 貴之				
研究期間	2003 年度							
研究経費	500 千円							

研究の概要 (200~300 字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

植物にはミトコンドリア、葉緑体と呼ばれるオルガネラが存在し、それぞれ呼吸、光合成という重要な生体反応を担っている。これらオルガネラに存在する DNA は活性酸素により損傷を受けており、オルガネラの機能維持にはこのオルガネラ DNA 損傷の修復が不可欠であると予想されるが、その実体は不明である。RecA タンパク質はバクテリアにおいて DNA 修復に中心的に関与するタンパク質である。本研究は申請者が発見したオルガネラで機能する可能性が高い RecA 相同タンパク質の機能を調べることを通して、DNA の修復機構の解明を目指す。

キーワード (研究内容をよく表しているものを 3 項目以内で記入。)

[オルガネラ] [RecA] [ヒメツリガネゴケ]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

我々はヒメツリガネゴケの核ゲノムに、バクテリアの *recA* 遺伝子と相同性が高い 2 種の遺伝子を発見し、*PprecA1*、*PprecA2* と命名した。さらに PpRecA1 タンパク質はミトコンドリアに、PpRecA2 タンパク質は葉緑体に移行することを見出した。バクテリア RecA の機能から類推して、これらのタンパク質はオルガネラ DNA の修復に関与していると予想された。ミトコンドリア、葉緑体機能の重要性は言うまでもないが、その機能維持に必要な両オルガネラゲノム DNA の修復に関しては未知の点が多い。本研究は、我々が発見した 2 つの *PprecA* 遺伝子及び遺伝子産物の機能解析を行い、オルガネラ DNA の修復機構の全体像解明の足がかりを作る事を目的とした。具体的には(1)*PprecA* 遺伝子の発現解析、(2)DNA 損傷剤による PpRecA2 タンパク質の局在の変化、(3)*PprecA* 遺伝子の変異株の作成とその性質の解析、(4)オルガネラ DNA の損傷の検出 を中心として解析を行った。その結果、PpRecA1、PpRecA2 の植物オルガネラ内における機能を示唆する結果を得る事が出来た。

(1) *PprecA* 遺伝子の発現解析

生物が様々な環境変化に応答するためのシステムとして、遺伝子発現の調節があり、その中でも転写レベルにおける調節が第一の遺伝子発現調節機構として重要な役割を果たしている。大腸菌における DNA 損傷に対する応答もこれに準じ、細胞内に生じた DNA 損傷によって活性化された RecA タンパク質が引き金となり、ゲノムに存在する一連の (*recA* 遺伝子を含む) DNA 修復系遺伝子群の転写が誘導される (SOS 応答)。同様に、もし *PprecA* がオルガネラの DNA 修復に関与する遺伝子であれば、オルガネラへの DNA 損傷処理により *PprecA* の mRNA 発現レベルが上昇すると予想することができる。これを検証するため、ヒメツリガネゴケを DNA 損傷剤にさらして、ミトコンドリア DNA、あるいは葉緑体 DNA に損傷を与え、その際の細胞内における *PprecA1*、*PprecA2* の mRNA の発現量の変化を RT-PCR 法により解析した。その結果、DNA 損傷剤である MMS、ブレオマイシンいずれの処理時にも *PprecA1*、*PprecA2* 両遺伝子の mRNA 発現レベルの有意な上昇が見られた。この結果は、オルガネラの DNA 損傷を検知した何らかの因子が、DNA 損傷に対応する為に必要な各 *PprecA* の転写を誘導した結果であると考えられ、*PprecA* の DNA 修復への関与を強く示唆する。

(2) DNA 損傷剤による PpRecA2 タンパク質の局在の変化

PprecA2-GFP 遺伝子安定形質転換コケ細胞では、1 つの葉緑体内の 1 ヶ所に PpRecA2-GFP タンパク質が集中して存在していることを示す大きなスポットを形成し、これが葉緑体 DNA と一致することは既に報告した。今回そのスポットの DNA 損傷剤処理時の挙動を解析した。MMS で細胞に DNA 損傷を与え、6 時間後の GFP の局在解析を行ったところ、葉緑体内の大きなスポットは消滅し、葉緑体全体に GFP の小さなスポットが複数個観察された。同時に DNA 染色を行うと、この GFP のスポットは葉緑体全体に点状に散在している葉緑体 DNA と一致していた。この結果は、PpRecA2 タンパク質が DNA 損傷によりその分布が変わることを示し、恐らく損傷を受けた DNA 部分に PpRecA2 タンパク質が分配されるのではないかと考えられる。

研究成果の概要 つづき

(3) PprecA 遺伝子の変異株の作成とその性質の解析

PprecA1 の変異株に関しては、遺伝子破壊株が既に取得済みであり、その細胞は野生株に比べて太く短く、葉緑体が細胞中を埋め尽くすという異常形態を示し、細胞分裂を経るごとに異常の程度が増加する。PpRecA1 はミトコンドリアに移行することが判明していることから、*PprecA1* 破壊株ではミトコンドリアに異常が生じていると予想される。そこで、破壊株のミトコンドリアを可視化するためにミトコンドリア染色試薬 Mito-Tracker による染色を行った。しかし、破壊株のミトコンドリアは通常のみトコンドリアが染色される条件でも染色が出来ず、何らかの異常が生じている事が考えられた。この結果は、*PprecA1* の欠損がミトコンドリア機能の異常をもたらし、細胞の生育を著しく悪化させていることを予想させる。

現在までの相補実験や発現解析の結果から *PprecA1* の DNA 修復への関与が示唆されたため、*PprecA1* 破壊株のミトコンドリア DNA には損傷が蓄積され、コピー数が減少していると予想された。定量 PCR は DNA の (コピー数の) 定量を可能とする方法であるが、更にある種の DNA 損傷も検出できる方法であり、この定量 PCR 法により *PprecA1* 破壊株のミトコンドリア DNA のコピー数及び DNA 損傷の程度を解析した。ところが当初の予想とは異なり、*PprecA1* 破壊株のミトコンドリア DNA における損傷頻度やコピー数は野生株と差が無かった。*PprecA1* 破壊株のミトコンドリア DNA 損傷が定量 PCR 法の検出限界以下であったと考えることも可能ではあるが、その様な低度の損傷で顕著な生育異常を示すとは考えにくい。よって、*PprecA1* 破壊株のミトコンドリア DNA は正常であるか、あるいは PCR 法では検出できないような DNA 構造の異常が生じている可能性があり、*PprecA1* の DNA 修復以外の機能をうかがわせる。現在テクニッット法、電子顕微鏡法を用いて、*PprecA1* 破壊株のミトコンドリアの形態、DNA の量等を解析中である。

PprecA2 に関しては RNAi により *PprecA2* の発現を抑制した株を作成中であり、更に外来的に Dominant Negative 型 RecA を発現させて PpRecA2 の機能を阻害する株も作成中である。*PprecA1* に関しても同様の株を作成中である。

(4) オルガネラゲノム DNA 損傷の検出

上記 (3) で作成した、あるいは作成中の *PprecA* 変異株の DNA 修復能を評価するためには DNA 損傷を検出する必要がある。DNA 損傷には様々な種類が存在するが、二本鎖切断や一本鎖切断の検出法としてアルカリアガロース電気泳動法 + サザンブロット法、DNA 切断に加えてメチル化等の損傷の検出法として定量 PCR 法を確立した。アルカリアガロース電気泳動法では MMS による葉緑体 DNA 損傷を追うことができ、MMS 処理直後が最も損傷頻度が高く、その後は回復をたどっていき、数日で完全に回復する事が判明した。また、定量 PCR 法では MMS による DNA 損傷後の核 DNA、葉緑体 DNA、ミトコンドリア DNA 各々の修復の過程を追う事が出来た。*PprecA* の変異株の取得が済み次第、今回確立された DNA 損傷検出法を用いて変異株の DNA 修復能を検証する。特に定量 PCR 法は少量の試料での解析が可能であり、生育が悪い *PprecA1* 破壊株の DNA 修復の過程を解析するのに特に有効であると考えている。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版者、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

④学会発表

1. 小田原真樹、井上貴之、藤田知道、長谷部光泰、関根靖彦
「植物ミトコンドリアで機能する RecA 相同タンパク質の解析」
第 26 回 日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月
2. 井上貴之、小田原真樹、藤田知道、長谷部光泰、関根靖彦
「ヒメツリガネゴケ葉緑体で機能する RecA 相同タンパク質の解析」
第 26 回 日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月