



展 TENBO 望

DNA 損傷時における植物クロマチン動態のイメージング解析



松永 幸大

Matsunaga Sachihiko



平川 健

Hirakawa Takeshi

(東京理科大学理工学部応用生物科学科)

1 はじめに

生命は、正常な個体発生・成長を成し遂げるために、外的及び内的要因に起因する DNA 損傷に対して迅速に応答する必要がある。筆者らはモデル植物の一種であるシロイヌナズナを用いて、生物個体における DNA 損傷応答機構に対して研究を進めている。植物は動物や微生物と異なり、自ら動くことができない。そのため、DNA 損傷を誘導する環境ストレスに対して、独自の応答機構を有することが考えられている。シロイヌナズナに対して、DNA 損傷の一種である DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break : DSB) を誘導する γ 線や化学試薬ゼオシン処理をすると、根において細胞死、細胞分裂の停止、そして細胞肥大を伴う核内倍加が引き起こされる (図 1)^{1,2)}。

器官・組織の形態観察及び分子遺伝学的手法により解析が進められてきた植物の DNA 損傷応答機構について、特にクロマチン動態に着目して研究を進めてきた。動物培養細胞や酵母で

は、DSB が生じたクロマチン領域のモビリティの上昇が DSB 修復因子依存的に誘導されて、DSB 修復を促進すると考えられている³⁻⁵⁾。また、近年、酵母において DSB 修復の足場として核膜が利用されることが報告されており、細胞核内におけるクロマチン動態の変化が DNA 損傷応答において機能的意義を持つことが明らかになりつつある⁶⁾。このように、DNA 損傷応答研究において単細胞生物を材料にした研究はクロマチンレベルでの解析が進んでいるが、植物に限らず多細胞生物を材料にした研究はまだ進んでいない。

2 植物における生細胞クロマチンイメージング

DNA 損傷応答は生細胞における現象である。そのため、DNA 損傷時におけるクロマチン動態を解析するためには、生細胞におけるクロマチン動態を観察できる手法が必要である。植物細胞核におけるクロマチンイメージングに対し

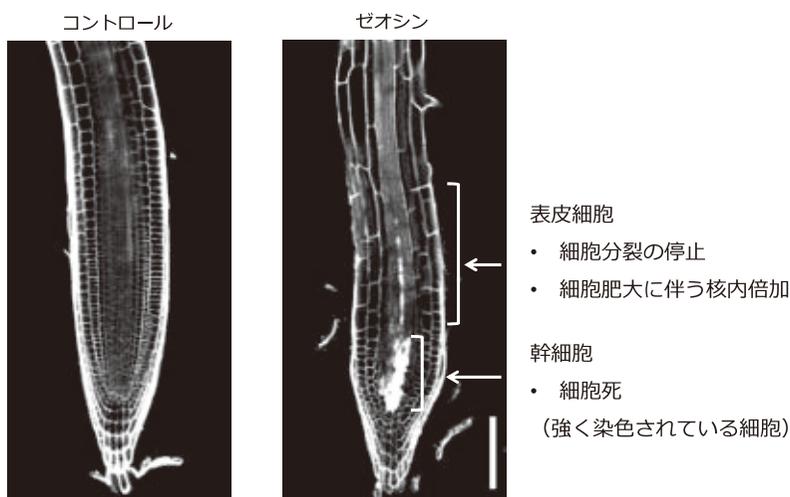


図1 DNA二本鎖切断誘導時におけるシロイヌナズナ根の形態変化
 DNA二本鎖切断誘導試薬ゼオシンで処理したシロイヌナズナ根を Propidium iodide 染色で観察した際の像。幹細胞では細胞死が誘導され、表皮細胞では核内倍加に伴う細胞肥大が引き起こされる。スケールバーは 100 μm を示す

では、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) が従来広く用いられてきた。この手法は、興味のある組織細胞におけるクロマチンの特定領域を蛍光プローブにより可視化する手法であり、形質転換体の作製を必要としないため、短期間で細胞核におけるクロマチンを観察することができる。しかし、FISH 法は細胞への蛍光プローブの導入及びクロマチンとプローブのハイブリゼーションのために、細胞の固定化及び高温処理を必要とする。そのため、生細胞におけるクロマチン動態の観察に FISH 法を利用することはできない。そこで、FISH 法に代わるクロマチンイメージング手法としてクロマチン蛍光タグシステムの一つである *lacO*/*LacI*-EGFP システムを用いた^{7,8)}。本システムは大腸菌のラクトースオペロンを使用したものであり、導入された生物個体においては、*lacO* の長鎖リピート配列が挿入されたクロマチン領域に対して *LacI* と緑色蛍光タンパク質 EGFP の融合タンパク質が恒常的に結合する (図 2)。そのため、生細胞におけるクロマチン動態をライブイメージングできる。

近年では、ゲノム編集技術である TALEN (transcription activator-like effector nuclease) や CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9) システムがクロマチンイメージングに利用されている^{9,10)}。例えば、TALEN を利用する場合は、DNA 結合ドメインである TALE と蛍光タンパク質との融合タンパク質を細胞に発現させる。ゲノム編集技術を活用することで、培養細胞レベルでは様々なクロマチン領域をライブイメージングすることが可能になりつつある。そこで *lacO*/*LacI*-EGFP システムが導入されたシロイヌナズナ形質転換体を実験材料として、DNA 損傷時における植物クロマチン動態をイメージング解析することにした。

3 植物クロマチン動態に対して DNA 損傷が及ぼす影響

lacO/*LacI*-EGFP システムが導入されたシロイヌナズナの細胞核においては、相同染色体座に由来する 2 つのドット状シグナルが観察され

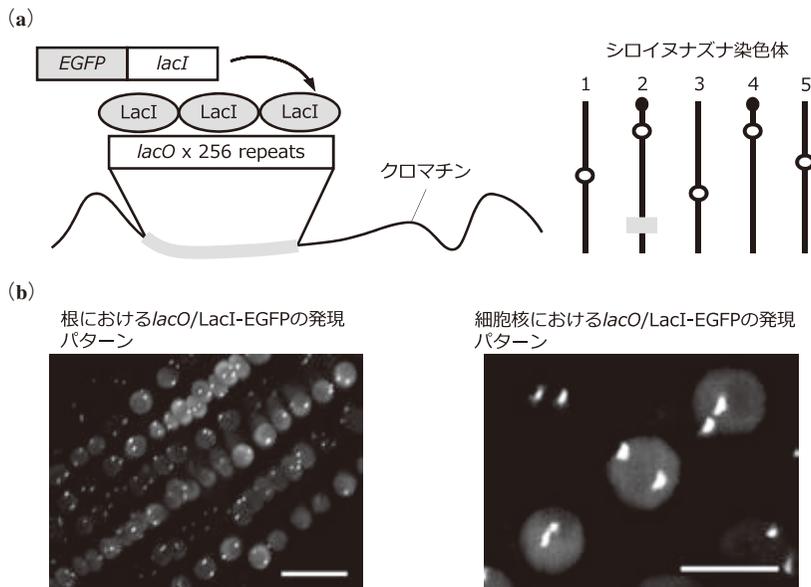


図2 *lacO/LacI-EGFP* システムによるクロマチンイメージング
 (a) クロマチン蛍光タグシステム, *lacO/LacI-EGFP* システムの概略図。第2番染色体に *lacO* リピート配列が挿入された個体を用いた。(b) *lacO/LacI-EGFP* システムが導入されたシロイヌナズナの根。全ての細胞核で本システムに由来するシグナルがみられ(左図, スケールバー 20 μm), 1つの細胞核からは相同染色体座に由来する2つのシグナルが検出される(右図)。スケールバーは 10 μm を示す

る(図2)。タイムラプスイメージングの結果、根の細胞核において、相同染色体座は一定の距離をとっていることが分かった。また、DNAマーカーであるヒストンH2Bを赤色蛍光タンパク質tdTomatoで可視化した形質転換体と*lacO/LacI-EGFP*システムが導入された個体の交雑個体を用いた解析から、相同染色体座の距離は細胞核の大きさに依存していることも分かった。次に、筆者らはDNA損傷時における相同染色体座の動態に着目した。DSBを生体内に誘導する γ 線をシロイヌナズナに対して照射した結果、照射線量に比例して相同染色体の距離が照射前に比べて短くなった。同時に、 γ 線照射後には相同染色体座がペアリングしている細胞核が多く観察された(図3)。生体内におけるDNA二本鎖切断を定量解析できるコメントアッセイを用い、 γ 線照射前後でのDSB量を調べた結果、相同染色体座の接近とDSB量

に相関がみられた。以上の結果から、 γ 線照射されたシロイヌナズナの細胞核において、相同染色体座はDSB修復のために接近していることが示唆された。

4 DNA損傷時にクロマチン動態を制御する因子の発見

シロイヌナズナ根の細胞核における γ 線照射による相同染色体座の接近について、筆者らは制御因子の存在を予想した。そこで、シロイヌナズナにおいてDSB修復に関与する因子の欠損変異体と*lacO/LacI-EGFP*システムが導入された個体の交雑個体を複数種類作製して、 γ 線照射時に相同染色体座が接近しない個体の単離を試みた。その結果、クロマチンリモデリング因子RAD54の欠損変異体においては、 γ 線照射をしても相同な染色体座の距離は短くなら

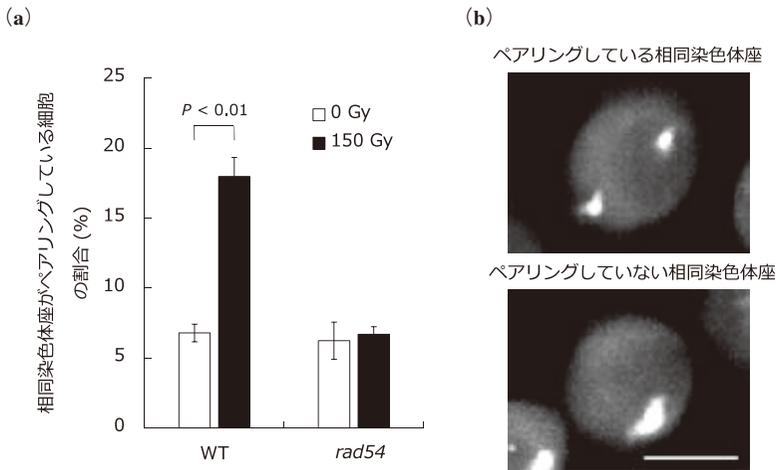


図3 クロマチンリモデリング因子 **RAD54** は相同染色体座のペアリングに関与する
 (a) 野生型のシロイヌナズナ (WT) に対して γ 線を照射すると、照射前と比べて、相同染色体座がペアリングしている細胞核が高い頻度で観察された。しかし、RAD54変異体 (*rad54*) ではそのような傾向はみられなかった。
 (b) 相同染色体座がペアリングしている細胞核とペアリングしていない細胞核。スケールバーは5 μ mを示す

ず、染色体座がペアリングしている細胞の観察頻度も上昇しなかった (図3)。RAD54は真核生物に広く保存された因子であり、DNA二本鎖切断修復経路の一種である相同組換え修復に機能する。*in vitro* ヒトヌクレオソーム再構成系を用いた生化学的実験により、RAD54はヌクレオソームからヒストンを除去する活性を持ち、相同組換えにおける相補鎖探索を促進することが報告されている¹¹⁾。筆者らの実験結果より、シロイヌナズナにおいても、RAD54はクロマチン構造の弛緩を通して相同組換え修復に関与していることが示唆された。

5 将来の展望

筆者らはシロイヌナズナの根の細胞核において、DNA損傷時にクロマチン動態が変化する現象を発見し、その分子機構の一端を明らかにした¹²⁾。今回の実験では根の表皮細胞の細胞核に限定して解析を行った。シロイヌナズナの根

は複数の組織及び細胞種から成る器官であり、DNA損傷応答はそれぞれ異なることが知られている。例えば、根の静止中心付近に存在する幹細胞ではDSBにより細胞死が誘導されるが、表皮細胞では核内倍加に伴う細胞肥大が誘導される (図1)^{1,2)}。クロマチン動態はDNA修復だけでなく転写や複製にも伴い変化する¹³⁾。細胞死や核内倍加を誘導する遺伝子がそれぞれ別に存在していると仮定すると、DNA修復時におけるクロマチン動態変化に関しては、細胞種ごとに異なっていることが予想される。今後はライブイメージング技術や光学的細胞操作を通して、細胞種ごとのクロマチン動態解析を進めていきたい。

【謝辞】

本研究は科学技術振興機構・戦略的研究推進事業、文部科学省・X線自由電子レーザー重点戦略研究課題事業、及び文部科学省・科学研究費の支援を受けて行われました。

参考文献

- 1) Adachi, S., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 10004–10009, doi:10.1073/pnas.1103584108 (2011)
- 2) Fulcher, N. and Sablowski, R., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 20984–20988, doi:10.1073/pnas.0909218106 (2009)
- 3) Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B.D., and Gasser, S.M., *Nat Cell Biol*, **14**, 502–U221, doi:10.1038/ncb2465 (2012)
- 4) Mine-Hattab, J. and Rothstein, R., *Nat Cell Biol*, **14**, 510–U136, doi:10.1038/ncb2472 (2012)
- 5) Soutoglou, E., *et al.*, *Nat Cell Biol*, **9**, 675–U121, doi:10.1038/ncb1591 (2007)
- 6) Horigome, C., *et al.*, *Mol Cell*, **55**, 626–639, doi:10.1016/j.molcel.2014.06.027 (2014)
- 7) Belmont, A.S., and Straight, A.F., *Trends Cell Biol*, **8**, 121–124, doi:10.1016/s0962-8924(97)01211-7 (1998)
- 8) Matzke, A.J.M., Watanabe, K., van der Winden, J., Naumann, U., and Matzke, M., *Plant Methods*, **6**, doi:10.1186/1746-4811-6-2 (2010)
- 9) Miyanari, Y., Ziegler-Birling, C., and Torres-Padilla, M.-E., *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 1321–U1252, doi:10.1038/nsmb.2680 (2013)
- 10) Chen, B., *et al.*, *Cell*, **155**, 1479–1491, doi:10.1016/j.cell.2013.12.001 (2013)
- 11) Machida, S., *et al.*, *Sci Rep*, **4**, doi:10.1038/srep04863 (2014)
- 12) Hirakawa, T., Katagiri, Y., Ando, T., and Matsunaga, S., *Sci Rep*, **5**, doi:10.1038/srep11058 (2015)
- 13) Misteli, T., *Cell*, **128**, 787–800, doi:10.1016/j.cell.2007.01.028 (2007)