

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 18 年度博士課程 進学
氏名 高師 義幸
指導教員名 田中 寛

論文題名

シロイヌナズナにおける Replication Protein A70 の機能解析

第一章 序章

一般に、植物は地表に固定された環境下で生育することから、DNA 障害を誘発するような過剰な光や多くの有害物質等にさらされている。そのため、植物は進化の過程で DNA の複製や修復等の代謝系を柔軟かつ精巧に制御する機構を取得していると考えられる。本研究では、酵母や哺乳類動物において DNA 複製から修復への移行を制御すると想定される因子 Replication Protein A (RPA) に着目した。RPA は、分子量 70-kD (RPA70) , 32-kD (RPA32) , 14-kD (RPA14) のサブユニットから構成される三量体タンパク質で、自身の DNA 結合配列を介して一本鎖 DNA に結合すること及び、他のタンパク質因子の機能を制御することにより、DNA 複製、修復、組換えやテロメアの維持に関与することが明らかとなっているが、植物においては未知の部分が多い。そこで本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナにおける RPA の機能解析を通して、植物の DNA 代謝系の一端を明らかにすることを目的とした。

第二章 シロイヌナズナにおけるRPA70 と相互作用する因子

RPA は、現在までに解析された全ての真核生物に保存されているが、ほとんどの生物種において各 RPA サブユニットは 1 種類ずつしか存在しない。しかし、シロイヌナズナには 4 種の RPA70 (AtRPA70a-d) と各々 2 種の RPA32 (AtRPA32a, b) 及び RPA14 (AtRPA14a, b) が存在する。そこで、AtRPA70 と AtRPA32 の各ホモログ間での結合特異性を、Yeast-two hybrid (Y2H)法および免疫共沈降法により検定した。その結果、AtRPA70a および AtRPA70c は AtRPA32a と、AtRPA70b および AtRPA70d は AtRPA32b と有為な相互作用が認められたことから、少なくとも 2 種の複合体形成様式が存在すると考えられた。このことは、4 種の AtRPA70 が系統解析により 2 つのグループ (グループ A : AtRPA70a 及び AtRPA70c、グループ B : AtRPA70b 及び AtRPA70d) に分類されることと一致した。

さらに、Y2H 解析により、AtRPA70a は、哺乳動物などの場合と同様に、DNA 修復機構やテロメア長の制御に関与する AtMre11 や、DNA 損傷および複製ブロックに対するチェックポイント機構に関与する AtRad17 と相互作用することが示された。また新たに、本因子が DNA 修復系及びテロメア長の制御に重要な AtKu70 や、テロメア結合因子と予想される AtTRB1 と相互作用することを明らかにした、一方、AtRPA70b, AtRPA70c 及び AtRPA70d は、AtKu70 及び AtRad17 との相互作用しか示さなかったことから、AtRPA70a は他の RPA70 とは異なる DNA 代謝系で機能する可能性が示された。

第三章 AtRPAサブユニットの発現様式および細胞内局在性解析

4 種 AtRPA70 及び 2 種の AtRPA32 の機能的な特性を明らかにするために、植物体組織における遺伝子発現様式をノーザン解析および定量的 PCR 法により検討した。その結果、グループ A に属する *AtRPA70a* 及び *AtRPA70c* と、それらと優位に複合体を形成する *AtRPA32a* は植物体全体で一様に発現していたのに対して、グループ B の

AtRPA70b 及び *AtRPA70d* と、それらと優位に結合する *AtRPA32b* は芽生えや花蕾などの分裂組織を含む試料や培養細胞において顕著に発現していることが明らかとなった。

また、各因子の細胞内局在性を解明するために、GFP 融合タンパク質のプロトプラスト中での一過的局在性を解析した。その結果、*AtRPA70a* は核とミトコンドリアに、*AtRPA70c* はミトコンドリアに、*AtRPA32a* はミトコンドリアと細胞質に各々局在していたのに対して、*AtRPA70b* と *AtRPA70d* は核に、*AtRPA32b* は細胞質に局在することが示された。これらの結果から、2つのグループに属する RPA は異なるオルガネラにおいて機能的に分化していることが示唆された。また、ミトコンドリアにおける RPA の局在性から、核 DNA の代謝以外にミトコンドリアにおいても DNA 代謝系に関与する可能性が示された。

RPA が一般に DNA 修復経路で機能すること、また本研究において *AtRPA70* が DNA 修復系の因子と相互作用したことから、DNA 損傷ストレスに対する *AtRPA70* の発現応答性をノーザン解析および定量的 PCR 法により検討した。その結果、実生苗を DNA 損傷薬剤であるメチルメタンサルホン酸 (MMS) やブレオマイシン (Bm) で処理することにより、4種の *AtRPA70* の転写産物量はいずれも4時間以内に増加することが明らかになった。

第四章 AtRPA70 変異体の解析

DNA 代謝機構や植物体の生長などにおける *AtRPA70* の機能を詳細に明らかにするために、4種の *AtRPA70* の T-DNA 挿入欠損株 (*70a*, *70b*, *70c*, *70d*) を供試した。いずれの欠損変異株も、通常の生育環境下では野生型株 (WT) と同様の生育を示したことから、シロイヌナズナの生育において RPA70 サブユニットは必須ではないと考えられた。一方、各変異株の実生苗について、MMS 及び Bm に対する感受性を調査したところ、いずれの変異株も WT に比べて同程度に感受性の上昇を示したことから、本

植物種における RPA70 ホモログは DNA 修復機構に必須な因子であると考えられた。

また、酵母や哺乳動物において RPA がテロメア長の制御に関与することが報告されていることから、AtRPA70 のテロメア長制御における機能を検討した。各変異体のロゼット葉におけるテロメア長を terminal restriction fragment (TRF) 法により測定した結果、70a では WT と比較してテロメア長が顕著に伸長していたのに対して、70c ではテロメア長の縮小が見られ、70b 及び 70d ではテロメア長の有意な変化は認められなかった。従って、1) 4 種の AtRPA70 はテロメア長の恒常性維持において異なる関与をすること、2) AtRPA70a は、他の生物種の場合と異なり、テロメア長を負に制御する働きをもつことが明らかになった。次に、テロメアにおける AtRPA70a の機能がテロメア DNA の伸長反応を司るテロメアーゼの活性に依存するかどうかを検討するため、70a とテロメアーゼの活性中心である Telomerase reverse transcriptase (TERT) との二重欠損株を作成し、テロメア長の変動を解析した。その結果、当該二重欠損株では 70a によるテロメア長の伸長が抑制されていたことから、AtRPA70a は植物独自の機構でテロメアーゼ依存的にテロメア長を制御していることが示唆された。なお、Y2H 法により AtRPA70a と相互作用することが示された AtTRB1 については、欠損変異株の解析からテロメア長制御への関与は確認されなかった。

第五章 総合討論

本研究では、高等植物における DNA 代謝機構の一側面として、シロイヌナズナにおける RPA70 ホモログの機能解析を行った。その結果、本植物に存在する 4 種 RPA70 の間には機能的な分化が認められること、並びに独自の機能を通じて DNA 代謝機構に関与することを明らかにした。今後は、上記因子のより詳細な機能解析を通して、高等植物における DNA 代謝機構への理解が深まるものと期待される。またこうした知見の蓄積は、生物の持つ基本的な生命維持機構の解明につながるのみではなく、有用植物への環境ストレス耐性能の付与といった応用面を考える上でも重要であると考えられる。