

放射線照射により誘導されるシロイヌナズナの細胞内遺伝子発現

Radiation-induced gene expression profiles of *Arabidopsis thaliana* cells

畑下昌範^{*1}、高城啓一^{*1}

Masanori HATASHITA, Keiichi TAKAGI

Abstract

Double-strand breaks (DSBs) are one of the most serious forms of DNA damage that can occur in a cell's genome. DSBs in DNA, which can occur spontaneously in the cell or be induced experimentally by irradiation, represent one of the most serious threats to genomic integrity. There are two major pathways for DSB repair: homologous recombination (HR) uses an intact copy of the damaged region as a template for repair, whereas non-homologous end-joining (NHEJ) rejoins DNA ends independently of DNA sequence. NHEJ rather than HR is the major pathway for repair of DSBs in organisms with complex genomes, including plants. It is well known that Ku80 protein plays a role in early step of NHEJ. Rejoining of DSBs introduced in DNA damage is catalyzed by DNA ligase enzymes. DNA ligase IV and XRCC4 catalyses the final step in the NHEJ pathway of DSB repair. In the present study, the transcript profiles of an *Arabidopsis thaliana* homologue (AtLig4) of human DNA ligase IV, an *Arabidopsis thaliana* homologue (AtXrcc4) of human XRCC4 and an *Arabidopsis thaliana* homologue (AtKu80) of human Ku80 following irradiation were determined by real time RT-PCR.

要約

DNA 2本鎖切断は細胞に起こるもっとも重大な DNA 損傷の1つである。DNA 2本鎖切断が細胞中で自発的あるいは放射線照射により実験的に引き起こされた場合、それはゲノムの維持に重大な脅威を与える。DNA 2本鎖切断の修復には2つの主要な経路がある。1つめの経路である相同組換えは、損傷した領域のもう一方の無傷のゲノムを修復の鋳型として用いる。2つめの経路である非相同末端結合は、DNA 配列に依存せずに DNA 末端同士をつなぐ。そして、植物などの大きなゲノムを有する生物における DNA 2本鎖切断の主要な修復経路は、非相同末端結合であるといわれている。一方、Ku80 は、非相同末端結合の初期段階において重要な役割をしていることが知られている。非相同末端結合時の再結合は DNA リガーゼによって触媒される。DNA リガーゼ IV と XRCC4 は DNA 2本鎖切断の非相同末端結合による修復経路における最終段階で機能している。本研究では、アラビドプシスのヒト DNA リガーゼ IV とヒト XRCC4 とヒト Ku80 のホモログを対象として、放射線照射後のこれらの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。

I. 緒言

現在、イオンビームによる植物の品種改良についての研究は、主に変異体を作成することと変異体の特徴づけに重点が置かれて進められている。今までに様々な変異体が生み出され、今後も共同研究を中心に変異体の選抜が行われることになるが、変異誘発率が低いために依然として多大なる栽培労力が必要とされるという問題が残っている。

一般的に、生物に電離放射線が照射されたときに、細胞内では DNA の損傷、すなわち鎖切断が引き起こされる。この損傷は鎖切断を検知するタンパク質によって検知され、その後の細胞周期停止や DNA 修復タンパク質の動員へと情報が伝達されていく。突然変異はその過程において生成されると考えられている。

^{*1} 研究開発部・生物資源グループ

したがって、変異誘発率を高める方法を開発するためには、放射線照射後に起こるこれらのタンパク質や遺伝子発現の動態を正確に把握する必要がある。本研究では、シロイヌナズナの幼苗を用い、DNA2本鎖切断の主要な修復経路の1つである非相同末端結合に関わる遺伝子(AtLig4, AtXrcc4, AtKu80)の放射線照射後の転写状況を、リアルタイム PCR を用いて経時的に調べた。

II. 方法

1. 材料

Arabidopsis thaliana の種子を播種し、発芽5日目の幼苗を用いた。

2. 照射実験

発芽した *Arabidopsis thaliana* の幼苗に対し、200MeV のプロトンビームを 5Gy 照射した。

3. RNA 抽出

照射後1, 3, 6, 12時間後の試料から RNeasy Plant Mini Kit を用いて、各々 RNA を抽出した。対照として、非照射の試料からも RNA を抽出した。

4. 逆転写反応

Reverse transcriptase と random 6-mer を用いて、cDNA を合成した。

5. リアルタイム PCR

対象とする遺伝子は、AtLig4, AtXrcc4, AtKu80 でいずれも DNA2本鎖切断の主要な修復経路の1つである非相同末端結合に関わる遺伝子である。また、内部標準としてハウスキーピング遺伝子 UBQ10 を用いた。上記の cDNA に対し、各遺伝子毎に設定したプライマーと蛍光プローブを用いて、FastStart Universal Probe Master(ROX)により、PCR 反応を行った。PCR 反応は、ABI7700 シーケンスデテクターを用いて、95 10 分の後 95 15 秒-60 1 分の 40 サイクルという反応条件で行った。PCR 反応中の蛍光強度の変化を記録した結果から、段階希釈した標準試料による検量線を作成した。各試料の遺伝子発現量は各々の蛍光強度と作成した検量線をもとに求めた。これらの発現量は内部標準である UBQ10 を用いて規格化した。最後に非照射時の発現量をもとに照射後の経時的な発現量の変化を相対値化した。

III. 結果と考察

今回調べた遺伝子 (AtLig4, AtXrcc4, AtKu80) は非照射時において、いずれも検出可能なレベルでの遺伝子発現を示した。

AtLig4 は照射後1時間ではあまり大きな発現量の増加を示さなかった。しかし、照射後3時間から明らかかな発現量の増加が認められ、その後12時間後まで発現量は増加し、12時間後において非照射時の約6倍の発現量を示した(図 - 1)。

AtXrcc4 は照射後3時間まではあまり大きな発現量の増加は認められなかった。しかし、6時間後から

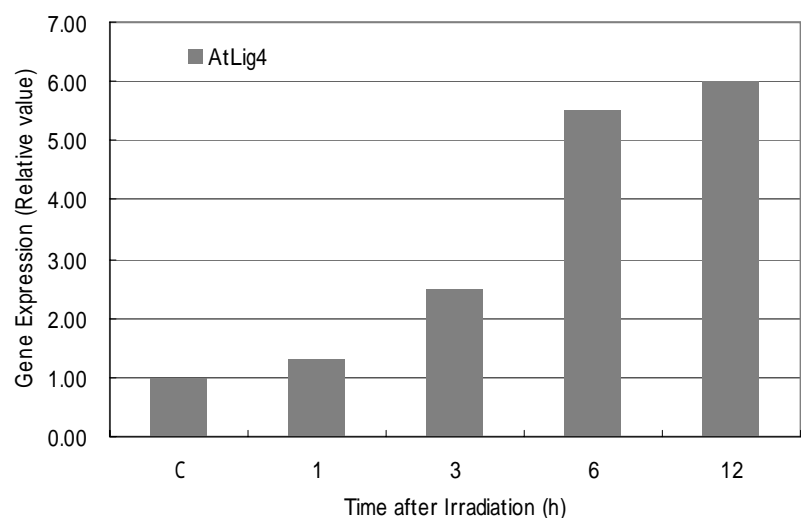


図 - 1 AtLig4 の発現パターン

横軸は5Gy のプロトンビームを照射した後の経過時間を表し、縦軸は非照射時(C)の発現量を1としたときの相対発現量を示す

著明な発現量の増加が認められ、12時間後には非照射時の約3.5倍の発現量を示した(図 - 2)。

AtKu80 は照射後3時間まではあまり大きな発現量の増加は示さなかった。しかし、6時間後から顕著な発現量の増加が認められ、12時間後には非照射時の約4.5倍の発現量を示した(図 - 3)。

非相同的末端結合の比較的初期段階に機能するとされる AtKu80 においても、その最終段階で機能するとされる AtLig4 や AtLig4 と強い相互作用で共存しているとされる AtXrcc4 のいずれにおいても、照射後の急激な遺伝子発現は認められず、照射後数時間経過した後に顕著な発現量の増加を示すことが明らかになった。

以上の結果から、今回調べた非相同末端結合に関わる遺伝子群は放射線照射による DNA 損傷を契機とした転写レベルでの制御を受けるが、それは照射直後に急激に起こるような遺伝子発現ではなく、照射後数時間経過した後にようやく発現してくるような緩やかな発現状況であることが明らかとなった。

結語

シロイヌナズナの幼苗を用い、DNA2本鎖切断の主要な修復経路の1つである非相同末端結合に関わる遺伝子 (AtLig4, AtXrcc4, AtKu80)の放射線照射後の転写状況を、リアルタイム PCR を用いて経時的に調べた。これらの遺伝子群は、放射線照射による DNA 損傷を契機とした転写レベルでの制御を受けるが、照射後数時間経過した後にようやく発現してくるような緩やかな発現状況であることが明らかとなった。

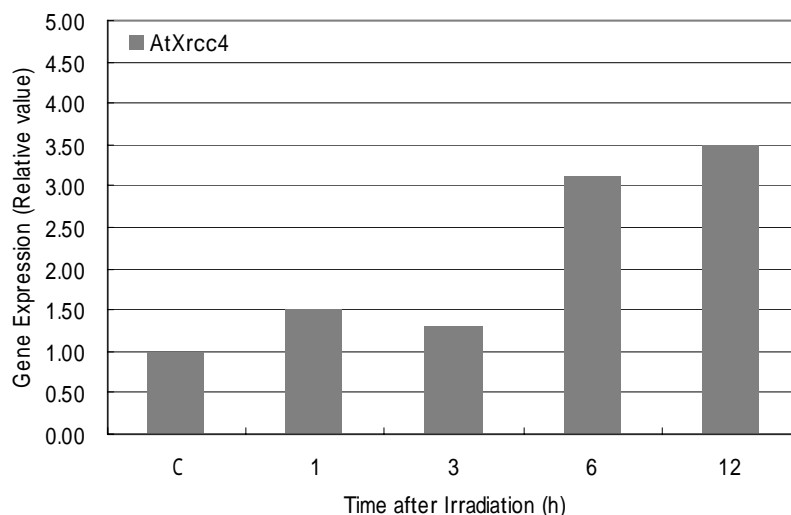


図 - 2 AtXrcc4 の発現パターン

横軸は5Gyのプロトンビームを照射した後の経過時間を表し、縦軸は非照射時(C)の発現量を1としたときの相対発現量を示す

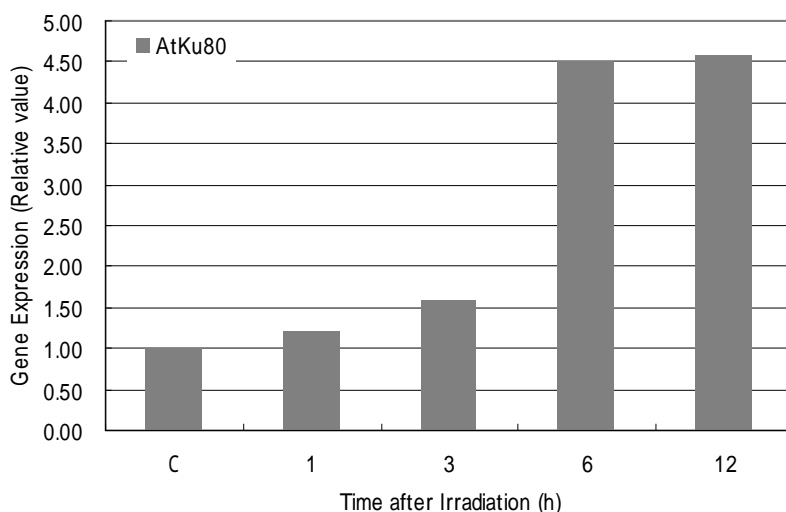


図 - 3 AtKu80 の発現パターン

横軸は5Gyのプロトンビームを照射した後の経過時間を表し、縦軸は非照射時(C)の発現量を1としたときの相対発現量を示す