

立教大学学術推進特別重点資金(立教SFR)

個人研究

2018年度研究成果報告書

研究代表者	所属部局・職	氏名
	理学部・教授	関根 靖彦 印
研究課題	ヒメツリガネゴケのオルガネラゲノム安定維持因子 MSH1 の解析	
研究期間	2018 年度	
研究経費 (1円単位)	(支出金額) 999,978 円 / (採択金額) 1,000,000 円	
<p>研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフは使用しないこと)</p> <p>植物の MSH1 タンパク質は、植物細胞のミトコンドリアと葉緑体のゲノムの安定維持に重要な役割を果たすが、その作用機構は不明である。MSH1 の機能の解明を目指し、解析を行ったところ、これまでの解析では、MSH1a の機能は不明であったが、本研究により、MSH1a がミトコンドリアゲノム上の短い反復配列間の組換えを抑制する機能を持つことが初めて示された。また、MSH1a 同士、MSH1b 同士の相互作用は起こるが、MSH1a-MSHb の相互作用は検出されなかった。この結果は、MSH1a と MSH1b はヘテロ二量体を形成せずに、それぞれ独立して機能することを示唆する。</p>		

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。)

[植物オルガネラ] [DNA 組換え] [ゲノム安定維持]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

(1) 酵母 Two-Hybrid 法によるタンパク質相互作用の検証

MSH1のバクテリアのホモログである MutS は二量体を形成して機能することが知られている。ヒメツリガネゴケの2種の MSH1a と MSH1b について、同様の二量体を作るかどうかを酵母 Two-Hybrid 法を用いて調べた。その結果、MSH1a 同士、MSH1b 同士が相互作用することが分かり、各 MSH1 は二量体(以上)で機能することが示唆された。植物の MSH1 において、二量体化の可能性を初めて示す結果である。一方、MSH1a と MSH1b 間の相互作用は確認できなかったことから、MSH1a と MSH1b がヘテロ二量体を作る可能性は低いと考えられる。

MSH1 と同様に植物オルガネラゲノムの安定化に関わる因子として、RECA1、RECA2、RECG が見出されている。これらの因子と MSH1 の関係を知る目的で、酵母 Two-Hybrid 法を用いて、これらの因子と MSH1 との相互作用を検証したところ、MSH1a-RECA1、MSH1a-RECA2、MSH1b-RECA1、MSH1b-RECA2、いずれの相互作用も確認できなかった。これらの事から、MSH1 と RECA は、直接の相互作用を介さない形で機能している可能性が示唆された。MSH1a、MSH1b と RECG との相互作用については確認実験が行えなかった。今後の課題である。

(2) MSH1B の GIY-YIG endonuclease ドメインの機能の解析

MSH1B が有する C 末の GIY-YIG endonuclease ドメインは他の植物の MSH1 にも共通して保存されているが、MSH1a はこのドメインを欠いている。このドメインの機能を知る目的で、染色体上の MSH1b 遺伝子上のこのドメインのコード領域を欠損したヒメツリガネゴケ変異株 (Msh1b- Δ GIY-YIG) を作成し、ミトコンドリア DNA 及び葉緑体 DNA 上の短い反復配列間での組換えの頻度を測定した。その結果、Msh1b- Δ GIY-YIG 株では、Msh1b の完全欠損株と同等の高頻度の組換えがおこることが分かった。この結果は、C 末の GIY-YIG endonuclease ドメインは、MSH1b の組換え抑制能に極めて重要であることを示している。

(3) 過剰発現による MSH1A の機能解析

Msh1a の欠損株では、Msh1b の欠損株とは異なり、短い反復配列間の組換え頻度の上昇は見られない。この結果から、MSH1a は組換えを抑制するのではなく、むしろ MSH1b の作用を干渉し、その結果として組換えを促進している可能性が想定された。この可能性を検証するために、野生株背景で MSH1a を過剰に発現する株を作成し、その株における組換え頻度を測定した。その結果、MSH1a の過剰発現株における組換え頻度は野生株と同程度であった。この結果は、MSH1a は組換え促進活性を持たないことを示す。

同時に、野生株背景で MSH1b を過剰に発現する株を作成したところ、その株における組換え頻度は野生株より減少した。この結果は、MSH1b が組換え抑制活性を持つことをさらに裏付けるものである。

研究成果の概要 (つづき)

(4) 相補による MSH1A の機能解析

MSH1A と MSH1B の共通部分の機能的差異を解析するため、Msh1b 欠損株の背景で、MSH1B 特異的な GIY-YIG ドメインを C 末に付加した変異 MSH1a を過剰発現する株 (MSH1a-GIYYIG ox) および野生型 MSH1b を過剰発現する株 (MSH1b ox) を作成し、その株における短い相同配列間の組換え頻度を測定したところ、MSH1a-GIYYIG ox 株における組換え頻度は、MSH1b ox 株とは同等にならなかった。この結果は、MSH1A と MSH1B の共通の領域の機能は異なっていることを示唆する。

一方、コントロール株として作成した、Msh1b 欠損株の背景で MSH1a を過剰発現する株 (MSH1a ox) では、ミトコンドリアゲノムにおける組換え効率が Msh1b 欠損株よりも大幅に減少した。この結果は、MSH1a がミトコンドリアゲノム上の短い相同配列間の組換えを抑制する機能を持つことを示す。これまでの解析では、MSH1a の機能は不明であったが、この解析により、MSH1a の機能が初めて示された。MSH1a の過剰発現による組換え抑制活性は、MSH1b の過剰発現よりも小さいものの、Msh1b 欠損株で起こる組換え効率を約 100 分の 1 に減少させるほどであり、MSH1a による組換え抑制機構が、MSH1b による組換え抑制機構と共通なのか、異なっているのかに興味を持たれる。

ミトコンドリアゲノムで確認できた MSH1a による組換え抑制は、葉緑体ゲノムでは見られなかった。このことは、MSH1a の機能が、葉緑体とミトコンドリアで異なっていることを示唆しており、その相違がどのような原因で生じているのかを突き止めることが今後の課題の 1 つになる。

(5) MSH1A と MSH1B の細胞内局在解析

MSH1A と MSH1B の機能的差異を解析するため、MSH1a を GFP (緑色蛍光タンパク質) と、MSH1b を RFP (赤色蛍光タンパク質) との融合タンパク質として発現させ、蛍光顕微鏡で両タンパク質の局在を別々に調べることを目指し、株の作成を進めた。その結果、MSH1a を GFP との融合タンパク質として発現させる株は作成できたが、MSH1b を RFP との融合タンパク質として発現させる株の作成には至っていない。

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、出版社、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)

佐藤 綺香、小田原 真樹、関根 靖彦

「オルガネラゲノム再編成抑制因子 MSH1 の機能解析」

第 41 回 日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 2018 年 11 月 28 日～11 月 30 日、横浜 (パシフィコ横浜)