



2016年7月15日

報道関係各位

植物の DNA 合成をリアルタイムで観察できる PCNA 法の開発

～作物のバイオマス増大プロセスの解析への応用に期待～

東京理科大学
科学技術振興機構

東京理科大学工学部応用生物科学科 松永 幸大 教授の研究グループは、植物の DNA 合成を生きたまま解析する PCNA 法の開発に成功しました。

植物の組織や器官は DNA を合成することで、細胞分裂による細胞数の増加や細胞サイズの増大をもたらし、バイオマス（生物資源の量）を増やします。そのため、DNA 合成の検出は、植物バイオマス制御研究において重要な解析手法の一つとなっています。しかし、従来の DNA 合成の検出方法は、植物を採取して死んだ細胞を解析するため、リアルタイムで植物の DNA 合成を追跡することはできませんでした。

今回、本研究グループは、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、生きた植物の DNA 合成を検出する PCNA 法を開発しました。PCNA(増殖細胞核抗原)に蛍光タンパク質を連結させ植物体内に発現させることで、DNA を合成している細胞を判別することに成功しました。その結果、植物を採取することなく、DNA 合成を検出することが可能になり、DNA 合成にかかる時間や起こるタイミングを知ることができるようになりました。

本成果により、農薬や化学物質の植物への影響評価、植物のバイオマス増大プロセスの制御メカニズムの解明など、農作物研究に大きく貢献することが期待されます。

※本研究成果は平成 28 年 7 月 15 日号の Nature Publishing の科学雑誌 Scientific Reports (サイエンティフィック・レポート誌) に掲載されました。

背 景

植物のバイオマスは細胞の分裂と細胞体積の増大の両方のシステムで制御されています。細胞が分裂する前には必ず、DNA の合成が行われます。また、細胞体積が増大するときも、DNA の合成が行われることがあります。このため、植物のバイオマスを増大させるプロセスを解析するためには、DNA 合成を検出することが重要な解析手法の一つとなっています。今までの DNA 合成の検出法では、植物に DNA の構成因子と同じ構造をした物質を取り込ませて、細胞を固定した後に、DNA 合成部位を検出していました。この手法では、植物を採取し、試薬で処理してから検出するために、植物体中での DNA 合成過程を経時的に解析することはできませんでした。そのため、植物がバイオマスを増加させる時に、いつ、どのくらいの期間で DNA 合成を行うかも未だによくわかっていません。そこで、生きた植物の組織や器官で、DNA 合成を経時的に解析できる手法の開発が期待されていました。

内 容

本研究グループは、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、生きたまま DNA 合成を検出できる PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen、増殖細胞核抗原) 法を開発しました。PCNA は DNA 合成酵素を制御するタンパク質で、DNA 合成が行われている細胞核内領域に集まることがわかっています。PCNA 法では、PCNA の遺伝子の発現の ON/OFF を制御する配列に PCNA の遺伝子と蛍光タンパク質の遺伝子を連結させて植物体内に導入しました。その結果、DNA 合成が開始されると PCNA の遺伝子の発現が ON になり、DNA 合成が終了すると PCNA の遺伝子発現が OFF になり、PCNA タンパク質も分解されて細胞核からなくなることがわかりました。この DNA 合成特異的な PCNA の局在を利用して、PCNA に連結させた蛍光タンパク質の分布パターンにより DNA 合成の時期を判別することができます。蛍光タンパク質を DNA 合成酵素本体ではなく、制御因子である PCNA に連結したことが、蛍光タンパク質が DNA 合成を阻害することなく DNA 合成の検出を可能にした技術的改良点と言えます。実際、DNA 合成が検出される細胞数や場所を、固定した植物を用いる従来法と比較したところ、同じ結果となりました。さらに、PCNA 法により、時間経過とともに、DNA 合成が細胞核の異なる領域で起こることを発見することができました。PCNA 法により、細胞核内の蛍光を発している領域の数や領域の大きさを検出することで、DNA

合成開始直後、合成中、終了直前の状態を区別することができました（図1および図2）。

さらに、PCNA法を使用して、植物の根の伸長を阻害する複数の薬剤の効果を解析しました。その結果、薬剤によって、DNA合成を阻害する場所やタイミングが異なることを明らかにすることができました。

本研究の社会的貢献

本研究成果により、植物のDNA合成を生きたまま解析することができるようになりました。本法に用いたPCNAは植物に広く保存されているタンパク質であるため、今後、有用作物のDNA合成の検出にも応用可能であると考えられます。本成果により、従来法で解析することが困難であった、植物バイオマス増大過程におけるDNA合成のタイミングや場所が明らかになると考えられます。また、農薬や化学物質の植物への影響評価にも貢献することが期待されます。

本研究は、東京理科大学において、国立研究開発法人 科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST）「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」（研究総括：磯貝 彰 奈良先端科学技術大学院大学 名誉教授）（研究課題名「エピゲノム制御ネットワークの理解に基づく環境ストレス適応力強化および有用バイオマス産生」、研究代表者：関 原明（理化学研究所 環境資源科学研究センター チームリーダー）および文部科学省ならびに日本学術振興会の科学研究費の助成を受けて実施した研究成果です。

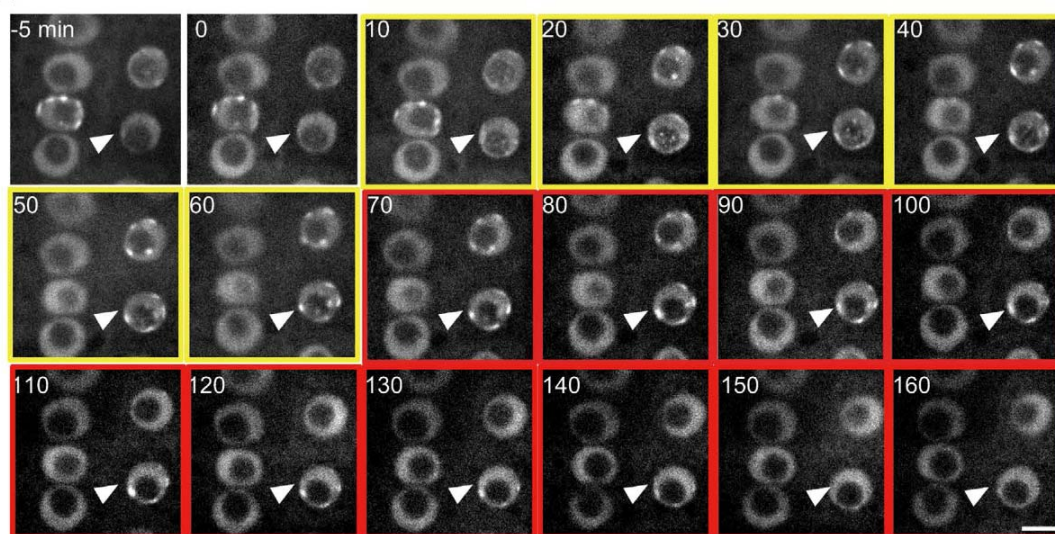


図1 PCNA 法による根における DNA 合成の経時的変化

PCNA 法により根の DNA 合成を経時的に解析することができるようになった。矢印の細胞核中の蛍光シグナル数や場所が変化していくことが捉えられた。左上の数字は分を示す。黄色枠が DNA 合成初期、赤色枠が DNA 合成後期である。このような DNA 合成の経時変化の解析時間は初めての報告である。

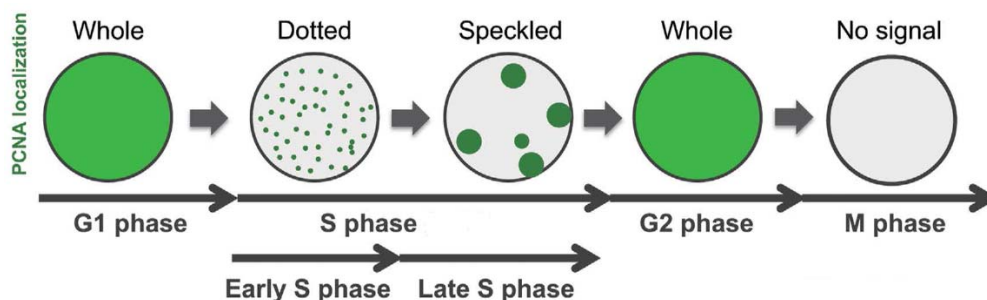


図2 PCNA 法により明らかになった植物の DNA 合成の経時変化

緑色部分が細胞核における DNA 合成領域を示している。S phase は DNA 合成期を示す。DNA 合成前期 (Early S phase) は DNA 合成が行われる場所が細胞核内に散在し、DNA 合成後期 (Late S phase) は DNA 合成が行われる場所が固まっていることがわかった。

～本件に関するお問い合わせ～
東京理科大学 研究戦略・産学連携センター
TEL : 03-5228-7440 FAX : 03-5228-7441
E-mail : ura@admin.tus.ac.jp