



Title	シロイヌナズナ茎頂分裂組織におけるDNA損傷の解析
Author(s)	
Citation	令和2（2020）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2021
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/80639
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和2年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	つちだ こうた 土田 康太	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	2 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	坂本 勇貴	所属	理学研究科		
研究課題名	シロイヌナズナ茎頂分裂組織における DNA 損傷の解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

○研究目的

生物は生活の中で刺激やストレスなどの外的環境の影響を受ける。様々な環境の中で次世代に同一形質が受け継がれるのは生殖細胞における遺伝情報が保持されているからである。動物の細胞は胚発生時に運命決定が行われる。一方、被子植物では胚発生後の栄養成長過程で茎頂分裂組織 (SAM) から葉、茎、生殖細胞など地上部のほぼすべての細胞が生み出される。SAM は当世代の個体の形質を決定するとともに、次世代まで伝わる遺伝情報を備えているため、植物は動けないという性質から外敵や環境変動の影響を受けやすい中で様々な環境ストレスから SAM を守る必要がある。事前実験にて、被子植物の代表的なモデル生物であるシロイヌナズナを用いて高濃度塩を含む培地で生育させたシロイヌナズナの SAM における塩ストレス応答遺伝子の発現量の変化を解析した。その結果、葉や根と同様に SAM においても高濃度塩条件下で塩ストレス応答遺伝子の発現量が変動することが明らかとなった。すなわち、高濃度塩を含む培地上では SAM も塩ストレスにさらされ、かつそれに適切に応答していることを示唆している。シロイヌナズナの葉においては、塩ストレスによって DNA 損傷が蓄積することが報告されている。SAM における DNA の損傷や変異は葉における損傷や変異と異なり、次世代に受け継がれる可能性があり、個体のみならず植物種にとって看過できない問題である。そこで本研究で高濃度塩条件下での SAM における DNA 損傷修復タンパク遺伝子の発現量の解析および DNA 損傷量を直接的に測定可能であるできるコメットアッセイを用いた DNA 損傷の解析を目的とした。

○研究方法

1.リアルタイム PCR による SAM 特異的な遺伝子の発現量の測定

シロイヌナズナ野生株を MS 培地にて計 7 日間栽培した。0, 300 mM の NaCl を含んだ MS 培地に移し替え 24h 塩処理を行った。塩処理後、実体顕微鏡下で SAM 周辺部を切り取り、20 個体を 1 バッチとしてサンプリングし、直ちに液体窒素によって凍結した。葉についても同様にサンプリングした。回収したサンプルから RNA を抽出した。その後、RNA 量の測定を行った。測定した

RNA 量をもとに標準化し、逆転写反応を行い cDNA を得た。SAM 特異的な遺伝子として 2 個 (CLV, WUS), 標準遺伝子 (ユビキチン) 1 個, 内部標準遺伝子として EF1 α について, 得られた葉, SAM それぞれについて cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。その後, 得られた結果それぞれについて T 検定を用いて検定した。

2.リアルタイム PCR による DNA 損傷マーカー遺伝子の発現量の測定

シロイヌナズナ野生株を MS 培地にて計 7 日間栽培した。0, 300 mM の NaCl を含んだ MS 培地に移し替え 24h 塩処理を行った。塩処理後、実体顕微鏡下で SAM 周辺部を切り取り、20 個体を 1 バッチとしてサンプリングし、直ちに液体窒素によって凍結した。葉についても同様にサンプリングした。回収したサンプルから RNA を抽出した。その後、RNA 量の測定を行った。測定した RNA 量をもとに標準化し、逆転写反応を行い cDNA を得た。DNA 損傷マーカー遺伝子として 3 個 (BRCA1, RAD51, PARD1), 塩ストレス応答遺伝子 (EF1 α) 1 個, 内部標準遺伝子としてユビキチンについて, 得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。その後, 得られた結果それぞれについて T 検定を用いて検定した。

3.DNA 損傷修復タンパク質可視化株(RAD54-GFP)の観察

DNA の二本鎖切断を可視化した形質転換株である RAD54-GFP 株を MS 培地にて計 7 日間栽培した。0, 300 mM の NaCl を含んだ MS 培地に移し替え 24h 塩処理を行った。塩処理後、実体顕微鏡下で SAM 周辺部を切り取り、固定したサンプルを作成した。作成したサンプルを共焦点レーザー顕微鏡で観察し、0, 300mM のサンプル間で DNA 損傷による蛍光の差を検証した。

4.コメットアッセイによる DNA 損傷の解析

シロイヌナズナ野生株を MS 培地にて計 7 日間栽培した。0, 300 mM の NaCl を含んだ MS 培地に移し替え 24h 塩処理を行った。塩処理後、実体顕微鏡下で SAM 周辺部を切り取り、SAM と葉をそれぞれ採取し、50 個体を 1 バッチとしてサンプリングし、直ちに液体窒素によって凍結した。回収したサンプルをカミソリの刃で細断することで核を細胞外へ叩き出し、単離核を得た。単離核を融解した LM Agarose と混合した。混合液をコメットアッセイ用スライドガラス (CometSlide) 上にピペットで均一に広げ、4℃で 30 分静置しゲルを固めた。スライドを TBE 緩衝液に浸した後、アルカリ性緩衝液 (0.3 M NaOH, 5 mM EDTA) で DNA を変性した。電気泳動を行った後、1 % TritonX-100 を含む PBS で中和し、70%、96% エタノールで脱水、乾燥後、SYBR Gold 染色液で染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。撮影した画像を解析し、DNA 損傷量を見積もる。

○研究成果

1.リアルタイム PCR による SAM 特異的な遺伝子の発現量の測定

RNA 量の測定の結果、十分量の RNA を抽出できていることが確認できた。リアルタイム PCR の結果、すべての遺伝子について DNA の増幅が確認された。葉と SAM における T 検定の結果、SAM において WUS で有意に発現量の増加を確認した。

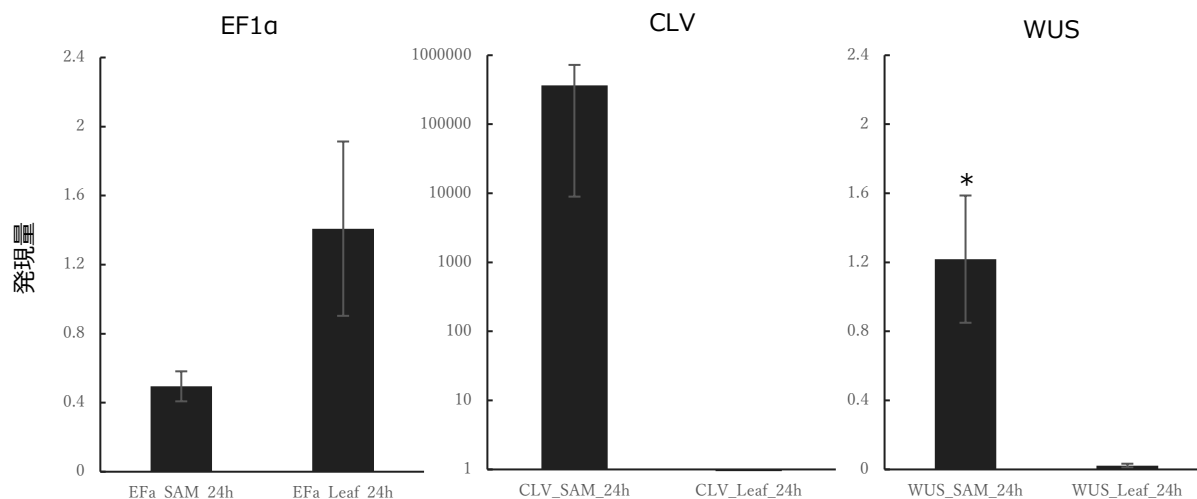


Fig.1 qPCR による SAM 特異的な遺伝子の発現量の測定 , *: $p < 0.05$, t-test により SAM と葉で検定, $n=10$,

* ユビキチンの発現量によって標準化

2.リアルタイム PCR による DNA 損傷マーカー遺伝子の発現量の測定

RNA 量の測定の結果, 十分量の RNA を抽出できていることが確認できた。リアルタイム PCR の結果, 葉においては 3 個のすべての遺伝子について DNA の増幅が確認された。葉における T 検定の結果, BRCA で塩ストレスによる有意な発現量の増加を確認した。SAM における T 検定の結果, 3 遺伝子すべてで塩ストレスによる有意な発現量の変化は見られなかった。

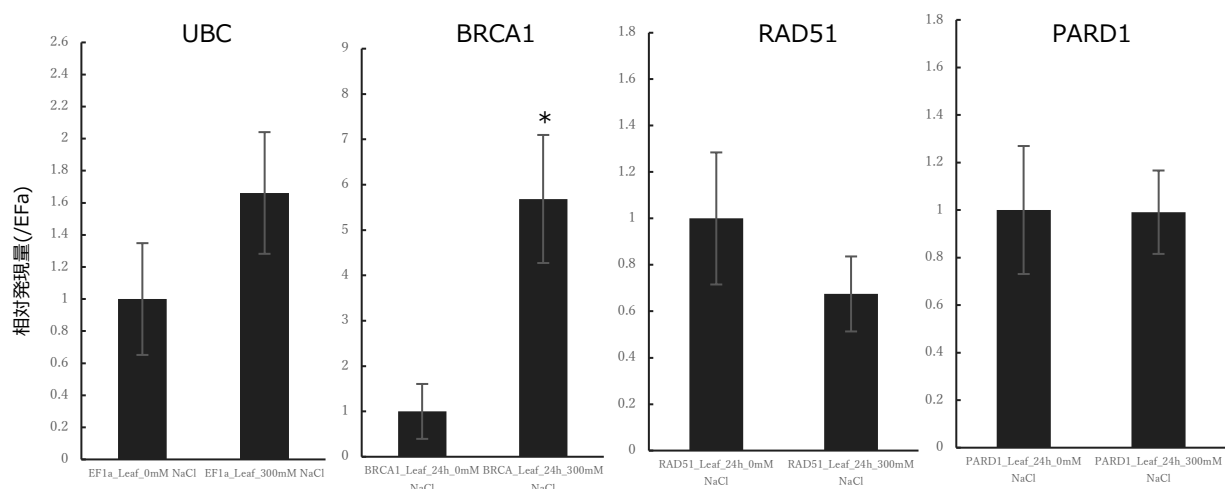


Fig.2 葉における 24 h 塩処理における RNA 量の比較 n.s.: $p > 0.05$, t-test により 0 mM と検定,

$n=5$, * 0mM NaCl の RNA 発現量を 1 としたときの値, * EFa 発現量によって標準化

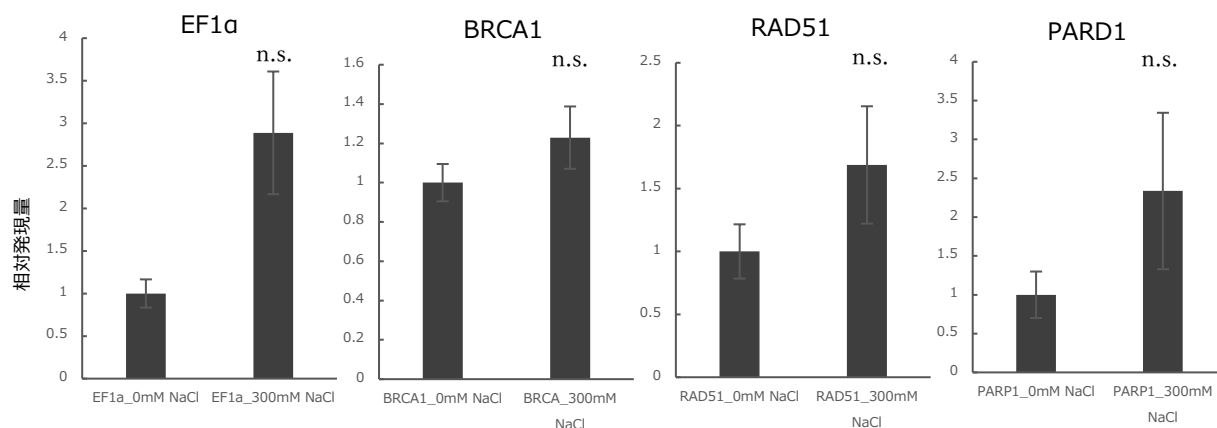


Fig.3 SAM における 24 h 塩処理における RNA 量の比較 n.s.: $p > 0.05$, t-test により 0 mM と検定

$n=5$, * 0 mM NaCl の RNA 発現量を 1 としたときの値, * ユビキチンの発現量によって標準化

3. DNA 損傷修復タンパク質可視化株(RAD54-GFP)の観察

0, 300mM の SAM のサンプル間で DNA 損傷によるスペckル状のシグナルは観察できなかった。

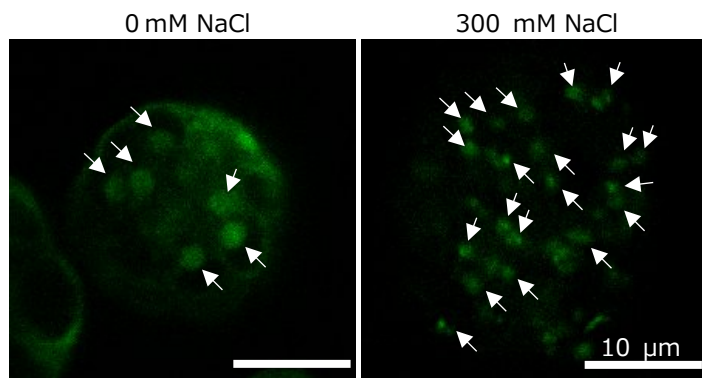


Fig.4 RAD54-GFP の像, 矢印は核を示す

4. コメットアッセイによる DNA 損傷の解析

SAM においては十分量の DNA を採取することができなかった。葉においては過剰な DNA 損傷が観察された。

○課題・展望

SAM 特異的な遺伝子の発現量の測定により SAM の切り出しを正確に行えていることを確認できた。また, DNA 損傷マーカー遺伝子の発現量の測定により塩ストレスにより葉では DNA 損傷が起こっているが, SAM では DNA 損傷が変化しないことが示唆された。しかし, 内部標準遺伝子のばらつきが大きいことから再測定を行うことで解析の再検証を行いたい。コメットアッセイによる DNA 損傷の解析では SAM の DNA の抽出, コメットアッセイの手法に問題があったと考えられる。そのため, SAM の DNA の抽出方法, コメットアッセイの手法について改良する必要がある。また, 今後, SAM において塩ストレスによる DNA 損傷が起こらない原因を解明したいと考えている。

○引用文献

Alex B., Andrey G., Andriy B., Igor K., (2010) Plant Cell Physiol. 51(6): 1066–1078