

<<まえがき>>

アカパンカビにおける活性酸素を介した光信号伝達の遺伝学的解析

Genetic Analysis of Light Signal Transduction Mediated by Reactive Oxygen Species in *Neurospora crassa*

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 横浜市立大学 蓮沼仰嗣 Yokohama City University Kohji Hasunuma

<<英文サマリー>>

As an early event during light signal transduction we have proposed nucleoside diphosphate kinase -1 (NDK-1) will be a transducer of the signal. Upon illumination by blue, NDK-1 showed an increase in the phosphorylation of it. The point mutant *ndk-1^{P72H}* showed sensitivity to methyl viologen and hydrogen peroxide, as a *sod-1* (super oxide dismutase) mutant. did. These two mutants showed lack of light induced perithecial polarity. Although *ndk-1^{P72H}* showed reduced rate of accumulation of carotenoid in the mycelia, *sod-1* showed acceleration of it. NDK-1 was suggested to form protein complex with catalases, Cat-1, Cat-2 and Cat-3, which were cloned and tried to knock out the genes. The gene for *ndk-1* was also knocked out to obtain final results concerning to the function of NDK-1 during light signal transduction. The mutants, *ndk-1^{RIP-1}* and *ndk-1^{RIP-2}* showed no phosphorylation activity of NDK-1. *ndk-1^{RIP-1}* produced no mRNA for *ndk-1*. However, *ndk-1^{RIP-2}* produced truncated NDK-1 protein. Both mutants accumulated reduced amounts of carotenoid forming yellowish mycelia. NDK-1 was strongly suggested to be a transducer of light regulating intracellular ROS possibly by interacting with catalases. We isolated methyl viologen resistant mutants from wild type and *ndk-1^{P72H}*. Two mutants crossed into wild type three times were currently checked for their activity in super oxide dismutases and catalases.

<<本文>>

研究目的

アカパンカビはその生活環のなかで、多くの形態形成が光によって制御されている。光制御を受ける主要な発生過程をまとめてみると、以下ようになる。

1) 光による菌糸のカロテノイドの誘導合成, 2) 菌糸からの気菌糸および分生子 (コニーディア) 形成の光による誘導, 3) 概日性リズム (およそ1日のリズム) を示す分生子形成リズムの

光による位相応答, 4) 窒素源枯渇下の培地で, 光は原子囊殻形成を促進する, 5) 側面からの光照射による子囊殻の極性の誘導 (子囊胞子放出口, ピークを上方に形成する), 6) ピークの正の屈光性, 等である。

アカパンカビでは最近の研究により, 少なくとも3つの光受容体が存在するとされている。

i) WC-1, WC-2 は複合体, WC complex (WCC) を形成し, 光を受容すると共に, 核内に移行し, 転写因子として作用する。ii) VIVID (VVD) は WCC の機能を抑制する因子として働き, 光受容も行なう。iii) New opsin -1 (NOP-1) はバクテリオロドプシンに相似したタンパク質で, NOP-1 は光照射によりプロトンを放出するが, その機能は判明していない。WCC は多数の機能を持ち, その変異, *wc-1*, および *wc-2* は上記の 1), 2), 4), 5), 6) の過程において光照射の作用が見られない。また *wvd* 変異は菌糸におけるカロテノイドの光誘導が促進される。

これらの光受容体以降の過程を分子レベルで明らかにするために, アカパンカビ菌糸から調製した粗抽出液を用いて, 試験管内光信号伝達解析系を立てた。青色光照射は 15 kDa タンパク質のリン酸化を増大させた (小田, 蓮沼 1994)。15 kDa タンパク質は精製され, ヌクレオシド 2 リン酸キナーゼであることが同定され, NDK-1 と命名された (小倉ら 1999)。NDK-1 のリン酸化がほとんどない変異株, *ndk-1^{P72H}* が単離された (小田, 蓮沼 1997)。変異株, *ndk-1^{P72H}* は光による子囊殻極性の誘導が欠失していた (小倉ら 2001)。

以上の研究結果をもとにして, 光を感じる酵素, NDK-1 がどのような分子機構をもって, 光を感じ, 光に対応してカロテノイド合成および形態形成をしているかを決定することを研究目的とした。

研究経過

アカパンカビの野生株, スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)変異株, *sod-1*, *ndk-1^{P72H}* 菌糸の表面培養に光を照射すると, 野生株はカロテノイドを誘導合成した。*sod-1* 変異株は野生株より早く, およそ2倍の速度でカロテノイドを合成した。この系にアンチオキシダントを加えると, カロテノイド合成の速度が低下した。*ndk-1^{P72H}* 変異株は野生株のおよそ 1/2 の速度でカロテノイドを合成した。*sod-1* 変異株, および *ndk-1^{P72H}* 変異株は子囊殻の極性の光誘導が共に欠失していた。*sod-1* 変異株はスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)を過酸化水素 (H_2O_2)に変換する速度が低いため, 細胞内スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)は高いが, H_2O_2 レベルは低いと考えられる。 H_2O_2 レベルは時間をかけて高くなる考えられる。*ndk-1^{P72H}* 変異株はカタラーゼとの機能的な相互作用が野生株に比べ低く, カタラーゼの作用が弱く, 細胞内スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)はそのレベルが低いながら細胞内 H_2O_2 レベルは高いと考えられる。カロテノイド合成系遺伝子, *al-1*, *-2*, *-3* の発現が野生株は一過的になるのに対して, *sod-1* 変異株は長くつづく。カロテノイド合成と, スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$), および過酸化水素 (H_2O_2)の濃度の消長との関係は明解には解けていない。アンチオキシダントが明らかにカロテノイド合成を抑制するので, 活性酸素分子種が関与することは強く示唆される

(吉田, 蓮沼 2004)。

ノックアウト変異株, *ndk-1^{RIP-1}*, *ndk-1^{RIP-2}* が単離され, その菌糸のカロテノイド合成が調査された。菌糸は黄色, *ylo* 形質となり, 野生株とははっきり相違が見られた。このようにして NDK-1 は光信号伝達に関与することが強く示唆された。更にこれらの変異株, *ndk-1^{RIP-1}*, *ndk-1^{RIP-2}* は気菌糸および分生子が形成されず, また原子囊殻も形成されない。そのため雌性不稔の形質を示す。また菌糸の寒天培地上の初期の成育が台風のような, 渦巻状の形態を示した。*ndk-1^{RIP-1}*, *ndk-1^{RIP-2}* は前者は mRNA を蓄積しない。また後者は mRNA を蓄積するが NDK-1 タンパク質は途中でできず, 不完全な活性の無いタンパク質が産生される (李ら投稿中)。

菌糸のカロテノイドの産生については更に詳細に調査された。震盪培養した菌糸をろ紙の上に集め, 気相中で光照射した。暗黒対照に比べ, 光照射は明らかにカロテノイド合成を上昇させた。この実験を酸素ガス, 窒素ガスで空気を置換して, 同様の光照射を行なった。酸素ガスは有意にカロテノイドの生成を促進したが, 窒素ガスは促進しなかった。液体培地中で同様の実験をすると, 気相中に比べて, 光によるカロテノイドの合成誘導は有意に減少した。さらに液体培地に過酸化水素 (H_2O_2) を加えると, 光照射は液体培地中のカロテノイド合成を促進した (飯草ら, 投稿準備中)。このようにして, 活性酸素がカロテノイド合成速度を制御していることが強く示唆された。

さらにアカパンカビ野生株及び *ndk-1^{P72H}* 変異株から, メチルピオロゲン耐性株をそれぞれ, 25 株および 40 株単離した。これらを 2 回シングルセルをして核の単一化をした後, 3 回野生株に交配した 2 株について, そのスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性, カタラーゼ活性を測定した。SOD 活性は野生株との変化はないが, カタラーゼ活性は 3 種類のカタラーゼ, Cat-1, Cat-2, Cat-3 に付いて活性測定している。これらの変異株は菌糸のカロテノイド合成が低下し, 光照射下で菌糸は白かった。これらの変異株の形質からも, 活性酸素がカロテノイドの光誘導に関与していることが強く示唆された (王ら, 投稿準備中)。

考察

光信号伝達の研究は 1950 年代から研究がなされたが, 長い間その難解さから, 解かれざる難問として取り残されてきた。わたし等は 1990 年代初頭からその研究結果を出し始め, NDK-1 が光信号伝達の初期過程に重要な機能を持つことをアカパンカビおよびアラスカエンドウを用いて示してきた。アカパンカビの菌糸におけるカロテノイド合成の光誘導は, 光信号伝達の研究にとり, 非常によい系をあたえる。この系を用いて, 活性酸素が光信号伝達に重要な機能を持つことを強く示唆してきた。活性酸素はその寿命も短く, その分子種の正確な測定も, あまり容易では無い。そのため研究が取り残されて来た可能性がある。それはまた光信号伝達の研究が容易には解明されなかった理由の 1 つでもある。アカパンカビは遺伝子変異を用いた遺伝学が可能である為, 厳格な解析が可能であり, 困難な問題を解く良い研究材料を与えた。さらに推論になるが, NDK-

は Nm23H-1 として、がん転移をする悪性がん細胞ではその発現が低下しており、がんの悪性化に関与することが示唆されてきた。しかしその遺伝子をがん細胞で発現してもがん転移が改善されないなど、疑問点も多数あり、議論は残されたままになってきた。NDK がカタラーゼと複合体を形成し、過酸化水素の消去に機能があるとするなら、Nm23H-1 の mRNA が無くなった良性腫瘍は、活性酸素の除去能力が低いゆえに、更に悪性化する変異を受け易く成るだろう。このような推論も可能となる。更に最近の分類学では菌類は動物と極めて近縁であることが明らかとなってきた。両者を共通点のある生物として推論することはそれほど妥当性を欠くものではない。

研究発表

口頭発表

1. 蓮沼仰嗣, 吉田雄介, 李範揆; 「アカパンカビにおける活性酸素を経由する光信号伝達の解析」 日本遺伝学会 (仙台, 2003)
2. 蓮沼仰嗣; 「Light signal transduction via ROS in *Neurospora crassa*」 基礎生物学研究所研究会, 光生物学実験系としての藻類の展望, 基礎生物学研究所 (岡崎, 2003)
3. 蓮沼仰嗣, 吉田雄介, 矢部尚登; 「Light signal transduction via ROIs in *Neurospora crassa*」 第10回日本光生物学協会講演会 (奈良, 2003 年)
4. 蓮沼仰嗣, 吉田雄介, 李範揆, 矢部尚登; 「アカパンカビの光信号伝達とパラコート耐性株の解析」 日本植物学会第67回大会 (札幌, 2003 年)
5. 吉田雄介, 李範揆, 蓮沼仰嗣; 「活性酸素分子種がアカパンカビ光形態形成に与える影響」 第26回日本分子生物学会 (神戸, 2003 年)
6. 李範揆, 吉田雄介, 蓮沼仰嗣; 「Isolation of NDK-1 mutants by RIPing and genetic analysis of the NDK function in *Neurospora crassa*」 第26回日本分子生物学会, (神戸, 2003 年)
7. Kohji Hasunuma; 「Light signal transduction via reactive oxygen intermediates in *Neurospora crassa*」 Photosensory Receptors and Signal Transduction ; Gordon Research Conference (Ventura, USA, 2004)
8. 蓮沼仰嗣, 吉田雄介, 李範揆; 「Analysis of light signal transduction via ROS in *Neurospora crassa*」 日本植物生理学会 2004 年年会 (東京, 2004 年)
9. Kohji Hasunuma, Yusuke Yoshida, and Bumkyu Lee; 「Light signal transduction coupled with reactive oxygen species in *Neurospora crassa*」 The 58th Yamada Conference ; Light Sensing and Signal Transduction in Plant Photomorphogenesis (Okazaki, 2004)
10. Kohji Hasunuma, and Yusuke Yoshida; 「Reactive oxygen species couple in the process of photomorphogenesis in *Neurospora crassa*」 14th International Conference on Photobiology (Cheju, Korea, 2004)
11. Bumkyu Lee, Yusuke Yoshida, and Kohji Hasunuma; 「Morphogenetic characteristics

of knock-out mutants of nucleoside diphosphate kinase (NDK-1) in *Neurospora crassa* | 14th International Conference on Photobiology (Cheju, Korea, 2004)

12. 吉田雄介, 李範揆, 蓮沼仰嗣; 「アカパンカビにおける NDK とカタラーゼの相互作用の遺伝生化学的解析」 日本遺伝学会 (大阪, 2004 年)

13. 李範揆, 吉田雄介, 蓮沼仰嗣; 「アカパンカビ Nucleoside diphosphate kinase-1(NDK-1)欠損株の形態的特徴」 日本遺伝学会 (大阪, 2004 年)

誌上発表

1. Yusuke Yoshida, and Kohji Hasunuma, 2004, Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa* J. Biol. Chem. 279, 6986-6993.

2. Kohji Hasunuma, Yusuke Yoshida, and Bumkyu Lee; Light Sensing in Plants, Ed. Masamitsu Wada, Springer Verlag Tokyo, 2005, ; Light signal transduction coupled with reactive oxygen species in *Neurospora crassa*. in press.