

アカパンカビにおけるDNA損傷に応答したアポトーシス機構活性化の可視化に関する研究

Visualization of activated apoptosis cascade in response to the DNA damage in *Neurospora crassa*

プロジェクト代表者：田中 秀逸（理工学研究科・准教授）

Shuuitsu Tanaka (Graduate School of Science and Engineering)

はじめに

近年、ヒトも含めた高等真核生物においては、DNA損傷に対し、DNA修復系だけでなく、細胞周期チェックポイント系、アポトーシス系も含めた総合的な生物としての応答が注目されている。即ち、それらに関する遺伝子の役割が複雑に関連し制御されていることが明らかとなってきた (Antonio et al., 2006)。下等真核生物のアポトーシス機構は、出芽酵母での研究が先行しており、紫外線や活性酸素に応答したそれらの活性化が報告されている。アカパンカビでは、2つの株が共存した際、互いの核型によっては不和合性を起こすが、このときアポトーシスが関与することが示されている (Marek et al., 2003)。また、カビの仲間には、高等真核生物のDNA損傷応答の制御に関わるp53やアポトーシスで中心的な役割を持つBcl-2ファミリーをコードする遺伝子がないこと、アカパンカビにのみやはりアポトーシスで中心的な役割を持つ*apaf-1*ホモログ様の遺伝子が存在することなど、ゲノミクスから興味深い知見が得られている。

これらのことから、アカパンカビは下等真核生物としてより基本的なアポトーシス制御、DNA損傷応答機構を有していると考えられる。アカパンカビを解析することで、それらに関した新たな制御機構を同定する可能性が期待できる。その為に必要となるアカパンカビにおけるアポトーシスを可視化または定量化するシステムの構築を進めている。

研究経過・成果の概要

アポトーシス関連遺伝子の破壊株の解析

アカパンカビにおける2つの*metacaspase*遺伝子（以降*casp-1*, *casp-2*と表記）及び1つの*aif-1*遺伝子、*apaf-1*のホモログに関し既に破壊株を、作成もしくはFGSCより入手した。現在、それらの株の表現型、特に各種の変異原に関する感受性・突然変異生成頻度を調べている。その結果、4つの遺伝子それぞれの破壊株が4NQO（4-Nitroquinoline-*N*-Oxide）に対し野生株に比べ耐性を示す事が判った。現在、DNA修復関連遺伝子も含めた他の遺伝子変異との二、三重変異株を作成し同様の解析を進めている（成果の一部は平成19年度日本遺伝学会、平成20年度日本分子生物学会で発表）。

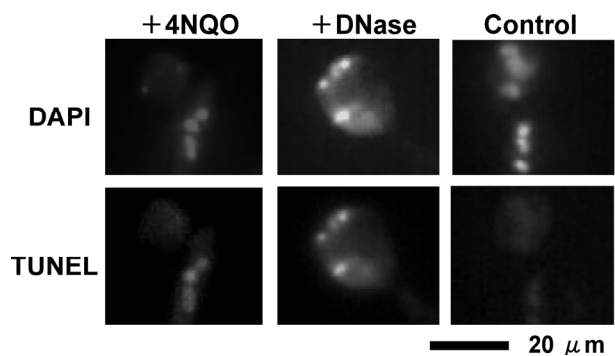


図1 DAPI及びTUNEL法による核の染色

4NQO処理によるアカパンカビの生存率低下にアポトーシス関連遺伝子の関与が示唆されたため、TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) 法によるアポトーシスの検出を試みた。TUNEL法は、アポトーシス細胞の核に見られるDNAの断片化を指標とした検出法で、動物細胞では確立された手法ではあるが、アカパンカビでの応用はほとんど知られていなかった。今回、薬剤処理の条件や固定法等を改良することで染色が可能となった。野生株で4NQO処理 (0.3 μ g/ml, 1時間) した細胞を 12 時間培養し、その後TUNEL法を用いて観察したところ、TUNEL法に陽性な核が観察された (図 1)。

アポトーシス関連遺伝子の標識

アカパンカビCASP-1, -2蛋白質のN末にFLAGタグを付けた蛋白質 (FLAG-CASP-1, FLAG-CASP-2) の強制発現の系を構築した (図 2 左)。CASP蛋白質は前駆体として造られ、アポトーシスに伴い切断され活性化する。哺乳類細胞などにおけるAIFは通常ミトコンドリア膜間腔に存在しているが、アポトーシス誘導時には、ミトコンドリアから放出され、核に局在することが知られている。そのため、AIFの核への移行が、アポトーシス細胞の検出に利用できると考えられる。AIF蛋白質についても、GFP標識をした蛋白質を発現させる準備を進めている。

アポトーシス関連遺伝子のDNA損傷に応答した動向解析

FLAGに対する抗体を用いて4NQO処理したアカパンカビから得られた抽出液中のFLAG-CASP-1を解析した所、処理濃度に伴うカススペース前駆体

(50 kDa) の減少と切断片 (12 kDa) の増加

(活性化) が示唆された (図 2 右)。現在、

細胞の処理方法等について、更に明瞭な効果が見られる条件を検討中である。GFP標識

蛋白質の発現は、選択マーカー及びPCRで確認後、細胞内での動向を共焦点レーザー顕

微鏡で確認する予定である。

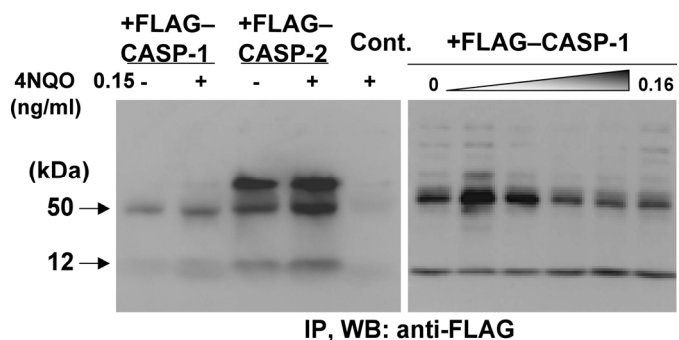


図 2 4NQO処理により誘導されたカススペースの切断

細胞周期チェックポイント関連遺伝子、DNA修復関連遺伝子変異株におけるアポトーシス関連遺伝子動向の解析

チェックポイント関連遺伝子に関し更に解析を進めた。アカパンカビにおいても、ATMとATRの下流でCHK1, CHK2によるこの機構の制御がなされる事を明らかにした。また、2つの系が複雑に関係しながらアカパンカビのDNA損傷応答、更には生育をコントロールする事が示唆された (論文発表済み)。また、他の生物においてチェックポイントの初期で損傷のセンサーとして働く事が示されている9-1-1複合体を構成する蛋白質のホモログを同定し、その破壊株の解析を行なった。細胞周期チェックポイント関連遺伝子とアポトーシス関連遺伝子の二重変異株も作製し、その解析も進めている。

発表論文

Genetic analysis of CHK1 and CHK2 homolog genes revealed a unique cross take between ATM and ATR pathways in *Neurospora crassa*. M. WakabayashiI, C. Ishii, H. Inoue and S. Tanaka, *DNA Repair* (in press).