

令和元年6月4日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26712029

研究課題名(和文)アカパンカビ子嚢胞子が山火事で目覚める分子機構の解明とその応用

研究課題名(英文)Heat break of ascospore dormancy by fire forest in *Neurospora crassa*

研究代表者

本田 信治 (Honda, Shinji)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：90632167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：アカパンカビ子嚢胞子は山火事の熱により半永久的な休眠状態を解除するが、その分子機構は謎である。本研究では網羅的な逆遺伝学法により、熱処理なしで自然発芽する欠損株、as-1とas-2を単離した。AS-1は子嚢胞子特異的なMAPK経路を活性化させて休眠を維持していることがわかった。一方、アカパンカビ子嚢胞子は山火事で発生する煙によりG蛋白質共役型受容体経路を活性化することで休眠を解除し、AS-2はこの経路を負に制御することを突き止めた。更に、煙成分は濃度依存的に休眠解除の温度閾値を下げることがわかった。これらの結果、精巧に制御されたアカパンカビ子嚢胞子の休眠維持・解除機構が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アカパンカビ子嚢胞子の驚異的な特殊能力は、怪奇現象として歴史を賑わしている。例えば、1842年にフランス軍のパン工場で大発生したアカパンカビの大調査が歴史に記されている。日本でも関東大震災のときの大火災後に、突如出現したオレンジ色の粉(アカパンカビ)が幻想的に東京中に舞い、人々を魅了させた(1925年、日本植物病理學會報、1巻6号、p15-19)。本研究課題は、歴史に刻まれたアカパンカビによる怪奇現象を分子レベルで謎解く学術的意義がある。また、生物の驚異的な特殊能力の応用は様々な形で人類の発展に貢献してきたが、このアカパンカビの特殊能力の応用もイノベーションにつながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：The heat-resistance ascospores of the filamentous fungi *Neurospora crassa* break their semi-permanent dormancy by heat shock. The mechanisms of dormant maintenance, heat activation and their relationship, however, remain enigmatic. Taking advantage of the *Neurospora* knockout collection, we isolated mutants spontaneously germinating without heat shock, named ascospore sleepless-1 and -2 (as-1 and as-2). We showed that AS-1 controls an ascospore-specific MAPK pathway and mutants lacking the pathway lose ascospore dormancy. We also identified a smoke-activated G protein signaling by isolating mutants insensitive to smoke and revealed that AS-2 negatively regulated the signaling. We confirmed that smoke stimuli via the G protein signaling regulates the tight threshold temperature of dormant break in a dose-dependent manner. We conclude that ascospore dormancy break by heat and smoke is finely controlled by at least two major pathways in *Neurospora*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アカパンカビ 休眠 熱耐性 子嚢胞子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上に生息する生物は驚くべき特殊能力を持ち、その能力の応用は様々な形で人類の発展に貢献してきた。アカパンカビ (*Neurospora crassa*) も他の生物にはない特殊な能力を持っている。その一つに、アカパンカビの子嚢胞子は山火事などで生物が絶滅する高熱状態によって休眠状態を解除し発芽する。実験系では 60 度、30 分で活性化させる。1920 年代にこの現象が B.O. Dodge により偶然発見され、これにより子孫株の単離とコンタミ防止を簡単な熱処理で同時に行うことが可能になった。これがアカパンカビを遺伝学のモデル生物としての地位へ導く 1 つの利点となり、1940 年代の Beale と Tatum による「1 遺伝子 1 酵素説」の研究に繋がった (1958 年、ノベル生理学・医学賞)。しかし、この驚異的な熱耐性能力と休眠解除能力を追った研究は技術面の問題もあり、1973 年以降は忘れ去られた (Hecker & Sussman, *J. Bacteriol.*, 1973)。

2. 研究の目的

アカパンカビの山火事で目覚める特殊能力は、28 種類あるアカパンカビの形態の中で子嚢胞子のみである。そのため、熱処理まで何年も休眠を維持する因子 (休眠維持因子) と子嚢胞子の生命活動に必須な蛋白質を熱から守る驚異的な熱耐性因子が存在すると考えられる。本研究の目的は、アカパンカビがカビの中で唯一 KO ライブラリーが整備されている利点を活かし、網羅的な探索法により、これらの因子を同定し、その分子機構の解明と応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) アカパンカビ子嚢胞子の休眠維持因子の同定

子嚢胞子に存在する休眠維持因子は欠損させると、熱処理なしで子嚢胞子の発芽が誘導されるはずである。そこで、KO ライブラリーをすべて交配して子嚢胞子を単離し、自然発芽する KO 株を網羅的に探索する。

(2) アカパンカビ子嚢胞子の熱耐性因子の同定

子嚢胞子に存在する熱耐性因子は欠損させると熱耐性が無くなるため、アカパンカビの他の形態と同様に熱処理により死滅するはずである。そこで、上記で単離した子嚢胞子の中で熱処理をすると死滅して発芽しない KO 株をリストアップする。次に、上記で同定した欠損させると熱処理なしに自然発芽する休眠維持因子とリストアップした遺伝子の二重欠損株を作製し、熱処理すると死滅するが、熱処理なしでは自然発芽し生存できる株を単離することで、熱耐性因子の同定を行う。

4. 研究成果

(1) アカパンカビ子嚢胞子の休眠維持因子の同定

① 休眠維持因子群の同定

約 1 万遺伝子のほぼ 9 割をカバーするアカパンカビ KO ライブラリーを用いて、すべての KO 株を交配して子嚢胞子を回収し、熱処理なしで自然に発芽する欠損株の単離を行う網羅的なスクリーニングを遂行した。その結果、休眠維持に必要な因子 90 種を同定することに成功した。この中で欠損させると高確率で休眠維持能力を失わせる新規遺伝子として、*ascospore sleepless-1, 2 (as-1, 2)* を同定した。AS-1 は機能未知の糸状菌に保存されたヒスチジンキナーゼで、この下流で働くことが予想される全ての MAP キナーゼカスケードの因子群もスクリーニングで単離した (これらを欠損させると子嚢胞子が自然発芽する)。一方、この *as-1* 欠損株は子嚢胞子特異的に発現し、種々の機能解析の結果、その他に異常な表現型を示さない。これらから、AS-1 は子嚢胞子の休眠維持に特化した子嚢胞子特異的な MAP キナーゼカスケードを制御することがわかった。

② 煙成分発芽経路の同定

上記で同定した AS-2 は、G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 経路の 3 量体 G 蛋白質を負に制御する (GTP から GDP へ変換する) RGS (Regulator of G protein Signaling) であった。つまり、この欠損株は常時 G 蛋白質が活性化した状態 (常活性体) になっている。そこで、G 蛋白質の常活性型をポイントミューテーションにより作製して解析した結果、*as-2* 欠損株と同様に熱処理なしで自然発芽することを確かめた。次に、この GPCR 経路を活性化し、子嚢胞子の休眠を解除するリガンドを探すため古い文献を調べた結果、穀物、トウモロコシ、サトウキビ、タバコなどの農作物にも含まれ、これらを燃やすと放出される煙成分の 1 つであるフルフラール (以下、煙成分) が、熱処理なしに子嚢胞子の休眠を解除する化合物であることがわかった (Emerson, *J. Bacteriol.*, 1948)。更に、3 量体 G 蛋白質

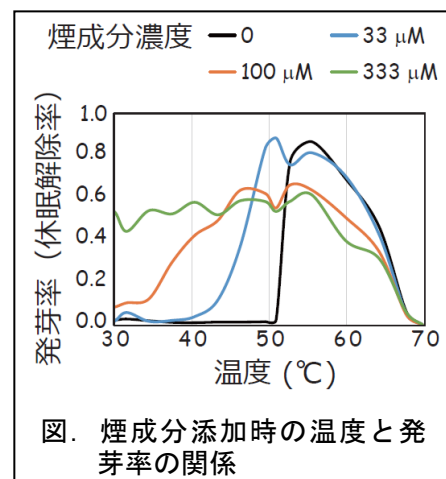


図. 煙成分添加時の温度と発芽率の関係

(G α 、G β 、G γ)、この下流のアデニル酸シクラーゼ、PKA の欠損株が、煙成分処理では休眠解除しないが、熱処理で休眠解除することを確かめた。つまり、この GPCR 経路は煙成分により活性化し、休眠解除する経路であることを明らかにした。面白いことに、この GPCR 経路の欠損株は子嚢胞子の休眠解除の温度閾値と熱耐性能力を上げることが発見された。次に、煙成分と休眠解除の関係を調査した結果、煙成分が濃度依存的に休眠解除の温度閾値を下げるということがわかった (図)。つまり、この GPCR 経路の標的は熱を感知する温度センサーで、煙成分はこの温度センサーの温度閾値を平温にまで下げることで自然に発芽させることが明らかになった。

(2) アカパンカビ子嚢胞子の熱耐性因子の同定

子嚢胞子の中で熱処理をすると死滅して発芽しない KO 株すべてを、上記で同定した *as-1* と 2 重欠損させ、熱処理なしで自然発芽させることで、その子孫株を死滅させずに単離するスクリーニングを実施したが、一つも単離することはできなかった。この結果から子嚢胞子の熱耐性因子は生存に不可欠で、KO 株を利用したスクリーニングでは単離できないことが予想された。一方、上記の GPCR 経路の欠損株は子嚢胞子の熱耐性能力を上昇させる。更に、これらの欠損株は他の形態でも熱耐性能力を上げるため、この欠損株において目的の熱耐性因子の発現や活性が顕著に上がっていることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) Klocko AD, Uesaka M, Ormsby T, Rountree MR, Wiles ET, Adhvaryu KK, [Honda S](#), and Selker EU.
Nucleosome Positioning by an Evolutionarily Conserved Chromatin Remodeler Prevents Aberrant DNA Methylation in *Neurospora*.
Genetics. 211(2):563-578 (2019) 査読有 doi: 10.1534/genetics
- (2) Bicocca VT, Ormsby T, Adhvaryu KK, [Honda S](#), and Selker EU.
ASH1-catalyzed H3K36 methylation drives gene repression and marks H3K27me2/3-competent chromatin
ELife. 7 e41497 (2018) 査読有 doi: 10.7554/eLife.41497
- (3) Jamieson K, McNaught KJ, Ormsby T, Leggett NA, [Honda S](#), and Selker EU.
Telomere repeats induce domains of H3K27 methylation in *Neurospora*
ELife. 7 e31216 (2018) 査読有 doi: 10.7554/eLife.31216
- (4) Klocko AD, Ormsby T, Galazka JM, Leggett N, Uesaka M, [Honda S](#), Freitag M, and Selker EU.
Normal chromosome conformation depends on subtelomeric facultative heterochromatin
Neurospora crassa.
Proceedings of the National Academy of Sciences. 113(52):15048-15053 (2016) 査読有 doi: 10.1073/pnas.1615546113
- (5) [Honda S](#), Bicocca VT, Gessaman JD, Rountree MR, Yokoyama A, Yu EY, Selker JM, and Selker EU.
Dual chromatin recognition by the histone deacetylase complex HCHC is required for proper DNA methylation in *Neurospora crassa*.
Proceedings of the National Academy of Sciences. 113 (41), E6135–E6144 (2016) 査読有 doi: 10.1073/pnas.1614279113
- (6) Galazka JM, Klocko AD, Uesaka M, [Honda S](#), Selker EU, Freitag M.
Neurospora chromosomes are organized by blocks of importin α -dependent heterochromatin that are largely independent of H3K9me3.
Genome Research. 26(8):1069-80 (2016) 査読有 doi: 10.1101/gr.203182.115
- (7) Adhvaryu KK, Gessaman JD, [Honda S](#), Lewis ZA, Grisafi PL, and Selker EU.
The Cullin-4 complex DCDC does not require key E3 ubiquitin ligase elements to control heterochromatin in *Neurospora*
Eukaryotic Cell. 14(1), 25-8, (2015) 査読有 doi: 10.1128/EC.00212-14

[学会発表] (計 8 件)

- (1) Uesaka M, Yokoyama A and [Honda S](#)
Ascospore sleepless-1 and -2 are required for ascospore dormancy in *Neurospora crassa*
Neurospore meeting 2018 2018 年 10 月
- (2) Uesaka M, Yokoyama A, Lewis ZA and [Honda S](#)
Shelterin is required for telomeric integrity in *Neurospora crassa*
The EMBO conference on Telomeres, telomerase and disease 2016 年 4 月
- (3) Uesaka M, Yokoyama A, Lewis ZA and [Honda S](#)
Shelterin is required for telomeric integrity in *Neurospora crassa*
Neurospore meeting 2016 2016 年 3 月
- (4) Uesaka M, Yokoyama A, Lewis ZA and [Honda S](#)
Identification and characterization of *Neurospora* Shelterin

- The 9th Cold Spring Harbor meeting on Telomeres & Telomerase, Cold Spring Harbor 2015年4月
- (5) Yokoyama A, Uesaka M and Honda S
Four color imaging by fluorescent protein tagging system in *Neurospora crassa*
The 28th Fungal Genetics Conference 2015年3月
- (6) Uesaka M, Yokoyama A and Honda S
Identification of *Neurospora* Shelterin
The 28th Fungal Genetics Conference 2015年3月
- (7) Uesaka M and Honda S
Heat break of ascospore dormancy in *Neurospora crassa*
Neurospore meeting 2014 2014年3月
- (8) 本田信治
アカパンカビの重複配列に対するエピジェネティクス制御
第7回エピジェネティクス研究会年会 2013年5月30日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

(1) ホームページ等

<https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/chromosome/>

(2) アウトリーチ活動

- ① 本田信治：JSTグローバルサイエンスキャンパス事業・福井大学FMHSインテンシブコース、発展講義「遺伝情報の理解」、2018年11月4日、参加者：高校生40名
- ② 本田信治：JSTグローバルサイエンスキャンパス事業・福井大学FMHSインテンシブコース、発展講義「遺伝情報の理解」、2017年11月3日、参加者：高校生40名
- ③ 本田信治：JSTグローバルサイエンスキャンパス事業・福井大学FMHSインテンシブコース、発展講義「遺伝情報の理解」、参加者：高校生65名、2016年12月10日
- ④ 本田信治：JSTグローバルサイエンスキャンパス事業・福井大学FMHSインテンシブコース、若手研究者講義「遺伝情報の理解」、参加者：高校生75名、2015年12月23日
- ⑤ Honda S：DNA methylation-dependent and independent silencing through HP1 in *Neurospora crassa*, Temasek Life Laboratory, Singapore, January (2015)
- ⑥ 本田信治：福井大学発 最先端研究～明日への挑戦～ 「ゲノム防御～利己的なDNAから守るしくみ」、2014年8月2日、福井大学 文京キャンパス アカデミーホール

(3) 受賞

平成26年度・文部科学大臣表彰・若手科学者賞

(4) 報道関連情報

- ① 福井新聞に掲載 (2014年5月7日)
- ② 中日新聞・日刊県民福井新聞に掲載 (2014年4月24日)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。