

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14584

研究課題名(和文)アカショウジョウバエの低温耐性を向上させる遺伝子発現制御の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms to strengthen cold tolerance in *Drosophila albomicans*

研究代表者

田村 浩一郎(Tamura, Koichiro)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：00254144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アカショウジョウバエは元来、熱帯東南アジアに分布していたが、1980年半ばに分布を西日本に拡大させた。この過程で、本種の低温順化による低温耐性向上が強化したことが分かっている。そこで、低温順化による低温耐性向上の遺伝機構を明らかにするため、低温順化によって発現量が変化する遺伝子をRNA-seqにより調べ、種間、種内系統間で比較した結果、アカショウジョウバエとキイロショウジョウバエ種間、またアカショウジョウバエ系統間でもそれらの遺伝子は大きく異なることが分かった。さらに、候補遺伝子の一つとされるPepckをGAL4/UAS系によって強制発現したところ、低温耐性に効果があることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Drosophila albomicans was originally distributed in tropical zones in Southeast Asia. However, the distribution was extended to western Japan during the 1980's. It has been known that the cold tolerance was strengthened by an enhanced effect of cold acclimation during the distribution expansion. In this research project, to clarify the genetic mechanisms of cold acclimation to enhance cold tolerance in *D. albomicans*, the genes whose expression is altered by cold acclimation were identified and compared between *D. albomicans* and *D. melanogaster* as well as between different geographic strains of *D. albomicans*. As the results, we found that only a few genes whose expression is altered by cold acclimation were shared by the two *Drosophila* species and by the different strains of *D. albomicans*. Moreover, using the GAL4/UAS system of *D. melanogaster*, we confirmed that an increase in the Pepck gene expression is responsible for the increase in the cold tolerance via cold acclimation.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：低温耐性 低温順化 比較トランスクリプトーム RNA-seq 分布拡大 環境適応 アカショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

生物進化の要因として遺伝子発現制御の変化が重要であることは、古くから「遺伝子制御仮説」として提唱されてきた。しかし、これまで生物進化に関する分子レベルの研究対象は、もっぱら構造遺伝子の塩基配列の変化に集中し、配列は変わらず発現の変化による形質の進化が対象となることはまれだった。ところが近年、外部形態の進化に関する分子レベルの研究によって、遺伝子発現の重要性が明らかにされつつある。その背景には、次世代シーケンサーを利用した RNA-seq や遺伝子改変技術の発展がある。すなわち、現在、ようやく技術的基盤が整い、「遺伝子制御仮説」を本格的に検証する段階に到達したといえる。

そこで、我々が注目したのは、アカショウジョウバエにおける低温耐性の進化である。アカショウジョウバエは元来、東南アジアを中心とする熱帯地域に分布していたが、1980年代半ばに分布域を北へと拡大させ、現在では西日本でも安定した集団が確認されている。変温動物の寒冷な地域への分布域の拡大には低温耐性の獲得が重要な要素であり、アカショウジョウバエもその低温耐性を獲得した可能性がある。これまでの研究により、低温耐性は低温順化によって向上することが分かった。そして、低温順化による遺伝子発現の変化がその大きな要因であることが明らかになった。このことは、生物が環境に適応し生存していくために必要な生理的性質の進化においても、遺伝子発現の変化が重要であることを示唆する。

2. 研究の目的

低温順化によって発現量が増加する遺伝子が低温耐性を司る遺伝子の候補となる。これらの遺伝子は、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析によって網羅的に探索できると期待されるが、RNA-seq によって原因遺伝子の探索を行った研究では、複数(多数)の遺伝子が候補遺伝子として見つかるが原因遺伝子として絞り込むことはできず、候補遺伝子の列挙とそのオントロジーの傾向を議論するだけにとどまる場合が多い。

そこで、本研究では、まず、アカショウジョウバエとキイロショウジョウバエの2種について、低温順化によって発現量が増加する遺伝子を RNA-seq によるトランスクリプトーム解析によって網羅的に調べ、共通する候補遺伝子を得ることによって原因遺伝子の絞り込みを行う。アカショウジョウバエとキイロショウジョウバエは、ともに低温順化によって低温耐性が向上すること、アカショウジョウバエで低温耐性によって発現量が増加するいくつかの遺伝子については、キイロショウジョウバエでは発現量が増加しないことが先行研究で分かっている。本研究では、まずキイロショウジョウバエで低温順化によって発現量が増加する遺伝子を調べ、アカ

ショウジョウバエとの共通性、多様性を明らかにする。

アカショウジョウバエは東南アジア、台湾、西日本に広く分布する。これらの分布域から採集された地域系統の中には、低温順化に対する反応(低温耐性向上および呼吸量の増加)が異なるものが見出されている。そこで、アカショウジョウバエの複数系統についてトランスクリプトーム解析を行い比較することにより、低温順化によって発現量が増加する遺伝子の共通性と多様性を調べ、低温耐性向上の原因遺伝子の絞り込みを行う。

モデル生物であるキイロショウジョウバエには、様々な遺伝子を人工的に色々な発現パターンで強制発現またはノックダウンすることができる *GAL4/UAS*、*GAL4/RNAi* 系統のコレクションがすでに存在している。そこで、アカショウジョウバエで低温順化によって発現量が増加する遺伝子の中で有力な候補遺伝子に関しては、キイロショウジョウバエで *GAL4/UAS*、*GAL4/RNAi* を用いて低温順化による発現量の変化を人工的に再現し、低温耐性に対する影響を実験的に検証することによって、候補遺伝子の中から原因遺伝子の特定にチャレンジする。

3. 研究の方法

(1) キイロショウジョウバエ、アカショウジョウバエ、それぞれ 15、20 で 1 週間低温順化した雄 20 個体、および、対照実験として、その間 25 に置いた雄 20 個体から全 RNA を抽出した。得られた全 RNA から cDNA ライブラリを作成し、Illumina HiSeq シーケンサーを用いて RNA-seq を行った。得られたアカショウジョウバエの配列データは、Trinity を用いて de novo アセンブルし、BLASTX を用いてキイロショウジョウバエの CDS データベースに対する相同性検索を行い、キイロショウジョウバエ遺伝子の相同遺伝子として同定しデータベースを構築した。得られた配列データベースに、各遺伝子由来のリード数を bowtie2 を用いてマッピングした後、eXpress を用いてカウント、edgeR を用いて遺伝子ごとに低温順化したハエとしていないハエの間で発現量が増加するかどうか統計的に検定した。

(2) 低温順化への応答が異なるアカショウジョウバエの 3 系統 (NG3、KKU202、WL1) について、Illumina MiSeq シーケンサーを用いて RNA-seq を行った。NG3 と KKU202 系統間では、低温順化による低温耐性向上の効果はあまり差は無いが、KKU202 系統は NG3 系統に比べて呼吸量が大きく増加する。一方、KKU202 と WL1 系統の間では、低温順化による呼吸量増加の程度に差は小さいが、WL1 は KKU202 に比べて低温耐性向上の効果大きい。これら 3 系統について、(1) と同様の解析を行い、低温順化にともなって発現量が増加する遺伝子を同定し、3 系統間

での比較を行った。

(3) 先行研究において、アカショウジョウバエの WL1 系統を用いて RNA-seq を行ったところ、低温順化によって発現量が大きく増加した遺伝子として *Pepck* が見つかった。*Pepck* は糖代謝に関わるため、低温耐性向上や呼吸量増加の原因となっている可能性が考えられる。そこで、本研究では、キイロショウジョウバエの *GAL4/UAS* 系統を用い、*Pepck* を強制発現し、低温耐性、呼吸量の変化を調べた。キイロショウジョウバエの *Pepck* の全コード領域を RT-PCR により増幅し、得られた断片を pUASTattB ベクターに導入した組換え DNA を作製した。得られた組換え DNA をキイロショウジョウバエ胚への注射によって導入し、*UAS-Pepck* 系統を作製した。得られた *UAS-Pepck* 系統を *Tublin-GAL4* 系統に交配して得られた *UAS-Pepck/Tublin-GAL4* ヘテロ接合体を 1 に 24 時間置いた後の生存率、および 0 における酸素消費量を測定した。

4. 研究成果

(1) アカショウジョウバエ、キイロショウジョウバエ、それぞれ低温順化したものしないものについて HiSeq シーケンサーを用いて RNA-seq を行った結果、2600~3000 万リードの配列データが得られた。これらのデータを解析した結果、アカショウジョウバエでは 184 遺伝子、キイロショウジョウバエでは 385 遺伝子が低温順化によって発現量が有意 ($FDR < 0.01$) に変化することが分かった (図 1)。

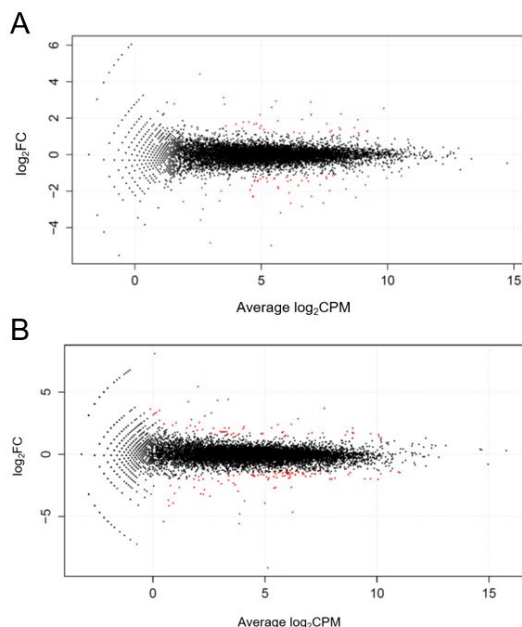


図 1. 低温順化の有無によるトランスクリプトームの差異を示す MA プロット
赤い点は低温順化によって発現量が有意 ($FDR < 0.01$) に異なる遺伝子を示す。(A) アカショウジョウバエ、(B) キイロショウジョウバエ

しかし、これらの遺伝子の中で、多くはいずれかの種のみで発現量が変化しており、2 種

で共通して発現量が変化した遺伝子は 14 遺伝子のみだった。また、その中 7 遺伝子の発現量は、いずれか一方の種で上昇し、もう一方の種では低下していた (表 1)。

表 1. アカショウジョウバエ、キイロショウジョウバエで共通して低温順化によって遺伝子発現量が変化した遺伝子

遺伝子名	遺伝子名
Diedel3	CG6910
CG11796	CG11407
Lip3	CG33281
CG12374	Nurf-38
CG5150	CG3348
CG7542	CG6839
CG12116	CG32444

赤字は発現量変化の方向が種間で異なる遺伝子を示す

以上の結果から、アカショウジョウバエとキイロショウジョウバエは、いずれも低温順化によって低温耐性が向上するが、低温順化にともなって発現量が変化する遺伝子の共通性は低いことが明らかになった。

(2) アカショウジョウバエの 3 系統についてそれぞれ低温順化したものしないものについて MiSeq シーケンサーを用いて RNA-seq を行った結果、1500~2600 万リードの配列データが得られた。これらのデータを解析した結果、NG3 系統では 161 遺伝子、WL1 系統では 117 遺伝子、KKU202 系統では 19 遺伝子の発現が低温順化によって発現量が有意 ($FDR < 0.05$) に変化することが分かった (図 2)。

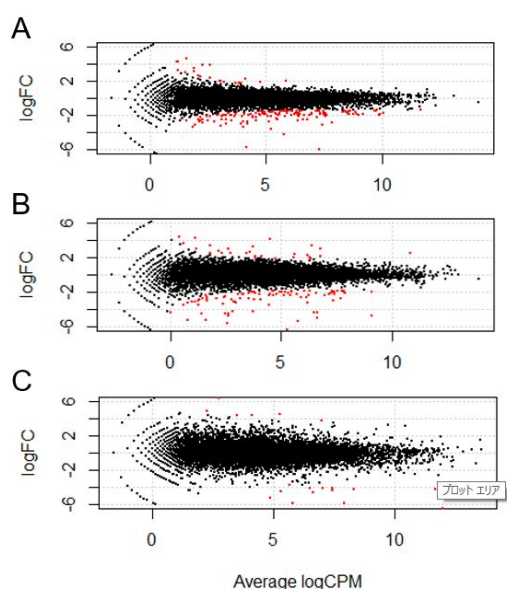


図 2. 低温順化の有無によるトランスクリプトームの差異を示す MA プロット
赤い点は低温順化によって発現量が有意 ($FDR < 0.05$) に異なる遺伝子を示す。(A) NG3 系統、(B) WL1 系統、(C) KKU202 系統

KKU202 系統については、原因は分からな

いがデータのばらつきが大きく、実験をやり直す必要があると思われるが、NG3 と WL1 系統の間では、20 遺伝子が共通していた。また、これらは全て変化の方向が一致しており、(1)で調べたアカショウジョウバエ、キロショウジョウバエの2 種類間の比較に比べ、より多くの遺伝子で低温順化による発現量の変化が共通しているものの、それぞれの系統で変化が見られた遺伝子の 12~17%に過ぎず、種内系統間でも大きな差異があることが明らかになった。また、3 系統全てに共通する遺伝子は CG18609 のみであった。CG18609 はマロニル-CoA から 3-オキソアシル-CoA を合成する酵素をコードする遺伝子で、細胞膜脂質の代謝に関わる可能性がある。

(3) pUAS^{TattB} ベクターに *Pepck* のコード領域を導入した組換え DNA を作製し、キロショウジョウバエに導入した結果、5 系統の *UAS-Pepck* 系統(1M~5M)を得た。これらの系統を *Tublin-GAL4* 系統に交配して得られた *UAS-Pepck/Tublin-GAL4* ヘテロ接合体について、*Pepck* の発現量を RT-qPCR によって調べたところ、5 系統全てで有意に上昇していることが分かった(図3)。

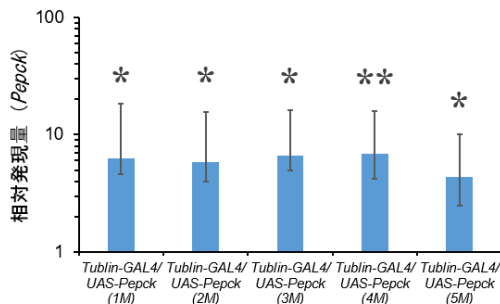


図3. *Tublin-GAL4/UAS-Pepck* における *Pepck* の発現量 *UAS-Pepck* を導入していない対照実験に対する相対値を示す。

そこで、これら5 系統について、低温耐性を測定した結果、5 系統全てにおいて向上が認められ、その中4 系統については、変化量は統計的に有意 ($P < 0.01$) であった。*Pepck* の発現上昇によって低温耐性は向上することが分かった(図4)。

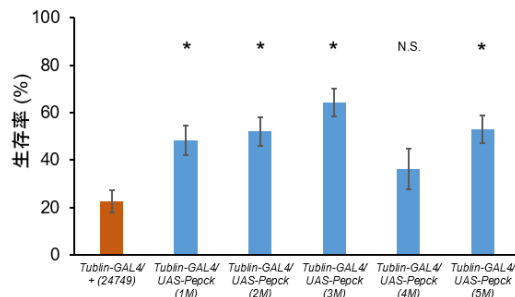


図4. *Tublin-GAL4/UAS-Pepck* ヘテロ接合体を 1°C に 24 時間置いた後の生存率 *Tublin-GAL4+/24749* は *Tublin-GAL4* と *UAS-Pepck* の導入に用いた 24749 系統とのヘテロ接合体。*: $P < 0.01$

一方、呼吸量に関しては、いずれの系統においても *Pepck* を強制発現していない場合に比べて差は小さく、統計的には全く有意ではなかった(図5)。

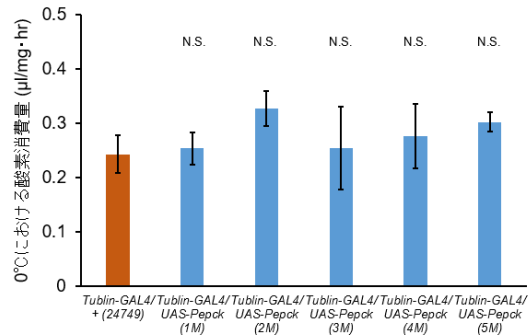


図5. *Tublin-GAL4/UAS-Pepck* ヘテロ接合体の 0°C における体重 1 mg 当たり、1 時間あたりの酸素消費量 *Tublin-GAL4+/24749* は *Tublin-GAL4* と *UAS-Pepck* の導入に用いた 24749 系統とのヘテロ接合体。

以上の結果から、低温順化による *Pepck* の発現上昇は低温耐性の向上はもたらすが、呼吸量には影響を及ぼさないことが分かった。すなわち、低温順化による低温耐性の向上と呼吸量の増加の間には因果関係はないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

(1) 木村友彦「アカショウジョウバエの低温耐性に関する比較 transcriptome 解析」2016 年 8 月 25 日・日本進化学会第 18 回大会・東京工業大学大岡山キャンパス(東京・大岡山)

(2) Tamura, Koichiro "Transcriptomic response for cold adaptation in *Drosophila*" Germany & Japan Workshop on Evolutionary Genomics 2016, 2016-3-22 (Mishima, Japan)

(3) 中村遥「Pooled RNA-Seq を用いたアカショウジョウバエ適応進化の検出」2015 年 9 月 7 日・日本遺伝学会第 87 回大会・東北大学川内北キャンパス(宮城・仙台)

(4) 中村遥「Pooled RNA-Seq を用いたアカショウジョウバエ適応進化の検出」2015 年 8 月 20 日・日本進化学会第 17 回大会・中央大学後楽園キャンパス(東京・文京区)

〔その他〕

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=evogen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首都大学東京・理工学研究科・教授
田村 浩一郎 (TAMURA, Koichiro)
研究者番号: 00254144

(2) 研究協力者

首都大学東京・理工学研究科・特任研究員

瀬戸 陽介 (SETO, Yosuke)

研究者番号：50738614

首都大学東京・理工学研究科・大学院生

中村 遥 (NAKAMURA, Yo)

首都大学東京・理工学研究科・大学院生

木村 友彦 (KIMURA, Tomohiko)

首都大学東京・理工学系・卒業研究生

鈴木 悠喜 (SUZUKI, Yuki)

首都大学東京・理工学系・卒業研究生

鈴木 麻理奈 (SUZUKI, Marina)