

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07308

研究課題名(和文) ネムリユスリカの極限乾燥耐性におけるトレハロースの複合的な役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pleiotropic role of trehalose in the anhydrobiosis of the sleeping Chironomid

研究代表者

コルネット リチャー (CORNETTE, Richard)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：20376586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ネムリユスリカと近縁種のマンダラネムリユスリカの幼虫はカラカラに乾燥しても死なない。両種は体内に大量のトレハロースを蓄積することにより乾燥の無代謝状態(Anhydrobiosis)を実現することを明らかにした。Anhydrobiosisの誘導メカニズムに関してはheat shock factor (HSF)という転写因子が乾燥過程で保護因子やトレハロースの合成経路の一部を誘導することを証明した。一方、トレハロースによるシグナル伝達は否定された。また、今まで注目を浴びなかった再水和過程のトレハロース分解が生命維持に必要な代謝機構を支えることにより生存に必要不可欠であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的に乾燥休眠を示すネムリユスリカ類の間では保護物質としてのトレハロース蓄積が保存されていることを証明した。heat shock factor (HSF)という転写因子が乾燥休眠の一つの主な引き金であることを明らかにしたのは乾燥耐性の誘導メカニズムを解明するために重要な第一歩であることを評価する。乾燥幼虫の再水和におけるトレハロースの分解と抗酸化能力の維持との関係を証明することができなかったものの、今まで不明だったその役割は生命維持に必要な代謝機構を支えていることが明らかになった。以上の成果が細胞や生体物質の常温乾燥保存技術の開発に貢献することを期待している。

研究成果の概要(英文)：Larvae of the sleeping Chironomid (*Polypedilum vanderplanki*) can survive almost complete desiccation. Larvae of a related species (*P. pembai*) also accumulate high amount of trehalose during desiccation to reach the same ametabolic state of anhydrobiosis. Concerning the mechanism of induction of anhydrobiosis, we showed that the transcription factor HSF (Heat Shock Factor) was inducing the expression of many anhydroprotectants and of a part of trehalose synthesis pathway in response to dehydration stress. In contrast, we showed that there was probably no participation of a putative trehalose signaling pathway in the induction of anhydrobiosis. Finally, the role trehalose degradation after rehydration, not considered until now, was investigated. We showed that trehalose degradation was necessary for survival after rehydration, probably through fueling the metabolic pathways needed to sustain life.

研究分野：昆虫の生理学と分子生物学

キーワード：ネムリユスリカ 乾燥耐性 Anhydrobiosis 培養細胞 トレハロース トレハラーゼ 酸化ストレス heat shock factor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネムリユスリカの幼虫はカラカラに乾燥しても死なない。体内の含水量が3パーセント以下に落ちても、無代謝状態で乾燥に耐え、再び水に戻ると蘇生して活動と発生を続ける。この極限乾燥耐性(Anhydrobiosis)を実現するために様々な乾燥保護因子の他にトレハロースは必要不可欠である。トレハロースは乾燥時に細胞膜を安定化させ、ガラス化することにより細胞や生体分子を保護する。しかし、トレハロース合成の制御機構がまだ解明されておらず、保護機能以外にもトレハロースの転写制御機能や抗酸化機能への関与が示唆された。ネムリユスリカでは、トレハロース合成酵素のTPP、TPS、トレハロース分解酵素のトレハラゼやトレハローストランスポーターTRET1などのトレハロース代謝に関わる遺伝子が同定されている。一方、ネムリユスリカ由来の培養細胞Pv11の常温乾燥保存プロトコルが開発され、RNAi遺伝子発現干渉法も確立された。本研究ではそれらの機能解析ツールを利用し、トレハロース合成の制御機構やトレハロースの複合的な機能を調べた。

2. 研究の目的

(1) ネムリユスリカ(*Polypedilum vanderplanki*)の幼虫における極限乾燥耐性とトレハロースの保護機能は知られているが、近年発見された近縁種のマンダラネムリユスリカ(*Polypedilum pembai*)の乾燥耐性について情報がなかった。マンダラネムリユスリカの乾燥耐性を調べ、トレハロースの関与を評価するのは最初の課題の目的となった。

(2) ネムリユスリカ幼虫の乾燥過程に体内に大量のトレハロースが蓄積している。トレハロース合成経路の酵素が同定されていたが、その制御メカニズムについてまだ調べられていなかった。今回はそのトレハロース合成の誘導メカニズムの解明を目指した。

(3) 乾燥耐性の誘導過程において、トレハロース自体がシグナル伝達に関わり、制御を調節する仮説があった。その伝達経路の中でトレハロース合成酵素のTPS-betaバリエーションがトレハロース受容体として機能しているのではないかと示唆されたため、その仮説を確認した。

(4) メタボローム解析の結果から、乾燥幼虫の再水和過程におけるトレハロースの分解から生産されるglucose-6-phosphateは解糖系に流れることよりペントースリン酸化経路に流れ、NADPHを生産し、再水和後の抗酸化能力を維持する仮説が浮き上がってきた。その仮説の証明を目指した。

3. 研究の方法

(1) マンダラネムリユスリカを新種として記載した。ネムリユスリカと同じプロトコルでデシケーター内に幼虫を乾燥させ、再水和後に生存率を計算した。同じ実験系で幼虫の乾燥前と乾燥後の重量を測定し、脱水率を計算した。また、乾燥幼虫を100℃でベーキング処理し、前後の重量を比較することにより含水率を計算した。最後にマンダラネムリユスリカの活動幼虫と乾燥幼虫のトレハロース含有量をHPLC解析により計算した。

(2) 幼虫の乾燥過程におけるトレハロース経路の誘導メカニズムを解明するため、ネムリユスリカのゲノム・トランスクリプトーム解析を行い、乾燥耐性を持たないヤモニユスリカ(*Polypedilum nubifer*)にはなく、ネムリユスリカの乾燥過程のみに発現する遺伝子の上流ゲノム領域に濃縮される配列を検索した。候補遺伝子の機能解析を行うためにネムリユスリカの培養細胞Pv11を利用した。Pv11細胞は600mMトレハロース溶液に暴露することにより乾燥耐性を誘導することができる。Pv11細胞の乾燥プロトコルを改良し、600mMトレハロース培養液の雫をシャーレの蓋に裏返しして乾燥すると、再水和後の生存率が高いことが分かった。更に三重染色(Hoechst-PI-Calcein AM)により細胞の生存率をより正確に評価できるプロトコルを確立

した。目的遺伝子に対する siRNA からランダム配列のコントロール siRNA をエレクトロポレーションにより細胞に導入し、トレハロース処理、乾燥、再水和後に Pv11 細胞の生存率を計算し、RNAi の効果を評価した。一方、RNAi による目的遺伝子の発現低下を確認するためにリアルタイム PCR をおこなった。

(3) TPS-beta が受容体としてトレハロースのシグナル伝達に関与しているか否かを確認するために上記と同じ方法で Pv11 細胞を利用した RNAi を行なった。トレハロース処理後の Tps-beta 遺伝子発現の低下を乾燥耐性関連遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR で評価した。また、トレハロースのシグナル伝達自体の受容性を評価するため、Pv11 細胞を 600mM トレハロース溶液処理の過程で強い抗酸化剤である N-acetyl-Cysteine (NAC) に暴露し、乾燥耐性関連遺伝子の発現誘導に対する影響をまたリアルタイム定量 PCR で評価した。

(4) メタボローム解析の結果から、ネムリユスリカ幼虫の再水和後にトレハロースの分解が抗酸化能力に関連するか否かを確認するためにまず、乾燥時の再水和後のトレハロース含有量を HPLC により測定した。それからネムリユスリカ幼虫にトレハロールを分解する酵素トレハラーゼの阻害剤 (Validoxylamine A, VAA) を体腔内にインジェクションし、乾燥・再水和後の生存率を評価し、HPLC によりトレハロース含有量を測定した。同じ実験方法で乾燥前・乾燥状態・再水和後の総合抗酸化能力アッセイを行なった。確認のため、ネムリユスリカの培養細胞 Pv11 を利用し、同じ VAA 処理に対し乾燥・再水和後の Pv11 細胞の生存率と増殖率を評価した。一方、VAA の副作用を排除するため、トレハラーゼ遺伝子の発現を RNAi 法で低下させ、遺伝子発現の確認をリアルタイム定量 PCR で行い、細胞の乾燥・再水和後の生存率と増殖率を評価した。

4. 研究成果

(1) マンダラネムリユスリカの詳細な形態学的な観察によりネムリユスリカの近縁種でありながら、確実に別種であることが判明した。マンダラネムリユスリカの乾燥耐性を評価した時、乾燥・再水和後にネムリユスリカと同じく 90% 以上の生存率が見られた。生重量と乾燥重量を測定した結果、マンダラネムリユスリカの幼虫もネムリユスリカの幼虫と同様、乾燥過程で 80% 以上の体重を失い、乾燥状態で幼虫の含水量は両種とも 3~4% しかなかった。以上の結果からマンダラネムリユスリカもネムリユスリカと同じ乾燥休眠 (Anhydrobiosis) を持つことが明らかになった。一方、幼虫のトレハロース含有量を測定した結果、両種も乾燥の過程で体内に大量のトレハロースを蓄積することが証明された。以上の結果をまとめて、マンダラネムリユスリカはネムリユスリカと同じ乾燥耐性を示し、その乾燥耐性を支えるメカニズムはネムリユスリカと同じくトレハロースの co-option により成り立つことが明らかになった。

(2) まずトレハロース合成酵素の発現制御について調べた。ゲノム・トランスクリプトーム解析より熱ショック応答転写因子 (heat shock factor, HSF) が乾燥耐性関連遺伝子の発現を制御していると示唆された。ネムリユスリカ由来の培養細胞 Pv11 を利用し、RNAi により HSF の発現を阻害した。その結果、HSF の発現が 80% 阻害され、予想通り HSF の RNAi 実験区では多くの乾燥耐性関連遺伝子の発現誘導が阻害された。HSF の RNAi 実験区でトレハロース合成酵素の TPP 遺伝子の発現が 30% 程度阻害された。しかし、トレハロース代謝関連遺伝子の TPS と TRET1 の発現に対する影響はなかった。したがって、HSF はトレハロース代謝の一部の遺伝子を制御していることが示唆された。一方、HSF の RNAi 実験区では乾燥・再水和後の Pv11 細胞の生存率が対象区の 20% しかなかった。その結果から、HSF はネムリユスリカの乾燥耐性の誘導メカニズムにおいて非常に重要な転写因子であることが明らかになった。

(3) TPS-beta が受容体としてトレハロースのシグナル伝達に関与しているか否かを確認するた

め培養細胞 Pv11 を用いて Tps-beta の RNAi 実験を行なった。その結果、pv11 細胞のトレハロース溶液処理 4 8 時間後に Tps-beta の遺伝子発現が RNAi 実験区では対象区より 80%抑制されているにも関わらず、主な乾燥耐性関連遺伝子発現の誘導に影響が認められなかった。しかも Pv11 細胞の乾燥・再水和後に Tps-beta の RNAi は細胞の生存率と増殖率に対して有意な影響がなかったため、TPS-beta を介したトレハロースのシグナル伝達が存在する可能性が低いと結論づけた。一方、酸化ストレスが乾燥耐性関連遺伝子の発現誘導に関わる可能性が高いというデータがあったため、Pv11 細胞を強い抗酸化剤の存在下でトレハロース処理した。その結果、トレハロース処理により誘導される乾燥耐性関連遺伝子の発現変化は抗酸化剤の存在下でほとんど見られなかった。したがって、酸化ストレスが乾燥耐性関連遺伝子の発現を誘導するために主な要因であることが明らかになり、トレハロースによるシグナル伝達が存在したとしても、その影響が検出できないという結論になった。

(4) ネムリユスリカの乾燥幼虫の再水和後におけるトレハロースの分解と抗酸化能力との関連性を確認するため、まずネムリユスリカの幼虫を用いてトレハラーゼの RNAi 阻害実験を行なった。その結果、トレハラーゼ遺伝子の RNAi により乾燥幼虫の蘇生率が低下したが、遺伝子発現を確認したところ発現阻害は不明瞭だった。そのためトレハラーゼの阻害剤 (VAA) による幼虫のトレハラーゼ阻害実験も行なった。その結果、再水和後 4 8 h にコントロールの 50~80% に対し VAA 処理区の生存率は 5%程度だった (図 1 A)。更に、トレハロース分解を確認する為に HPLC によりトレハロース量を測定した。再水和 20h 後にコントロール幼虫のトレハロース量は乾燥時に比べて 40%低下した。それに対し VAA 処理幼虫では乾燥幼虫のトレハロース蓄積が少ないという副作用があったものの、予想通りに再水和 20h 後に蓄積したトレハロースの分解が認められなかった。

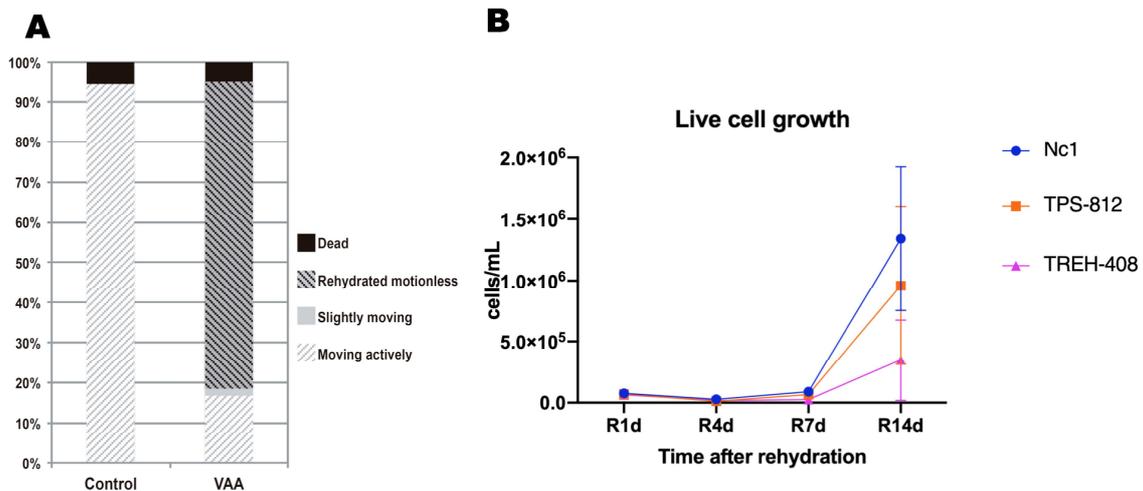


図 1 : (A) 対象区と VAA 処理区における再水和後 16 時間の幼虫の生存率 (死亡: dead, これから死ぬ: rehydrated motionless, 少し動く: slightly moving, 普通に泳ぐ: moving actively) (B) RNAi 実験における採水後の Pv11 細胞の増殖。Nc1 (対象区、random siRNA、青) TPS-812 (Tps に対する siRNA、オレンジ色) TREH-408 (Trehalase に対する siRNA、ピンク色)。トレハラーゼの RNAi のみ対象区に比べて細胞増殖が有意に低下した (P<0.1)。

一方、幼虫の総合抗酸化能力はトレハロースの量に比例して乾燥状態で高くなり、再水和後に元のレベルに戻る。VAA の副作用によりトレハロースの量も抗酸化能力も変動しなかったことから関連性を証明することも否定することもできなかった。しかし、再水和後 4 8 時間で VAA 処理個

体の80%以上が死ぬことから、トレハロース分解は再水和後の生存に必要不可欠であることを明らかにした。トレハロースからのエネルギー源が断たれたため幼虫が死んでしまう可能性もあるため、栄養豊富な状態で培養されるネムリユスリカの細胞 Pv11 を使った実験で VAA 処理を行った。通常の細胞増殖に対して VAA の毒性がなかったが、乾燥・再水和後に Pv11 細胞の生存率が半分に低下し、その後の細胞増殖悪影響を受けた。同じ Pv11 細胞を利用した RNAi 実験でトレハラーゼの遺伝子ターゲットした時、トレハロース処理後48時間でトレハラーゼ遺伝子の発現が80%以上に阻害されていることを確認した。更に Pv11 細胞の乾燥・再水和後にトレハラーゼ遺伝子の RNAi は細胞の生存率に影響がなかったが、細胞増殖を有意に低下させる効果があった(図1B)。以上の結果から再水和後におけるトレハロースの分解は再水和後の幼虫の生存に必要不可欠であることを証明し、そのトレハロース分解はエネルギー代謝以外の生命維持に必要な代謝機構を支えていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Yamada, T. G., Suetsugu, Y., Deviatiiarov, R., Gusev, O., Cornette, R. et al.(4名)(2018). Transcriptome analysis of the anhydrobiotic cell line Pv11 infers the mechanism of desiccation tolerance and recovery. **Scientific Reports**, 8(1), 149. DOI:10.1038/s41598-018-36124-6 (査読有り)
2. Mazin PV, Shagimardanova E, Kozlova O, Cherkasov A, Surtomin R, Stepanova VV, Stupnikov A, Logacheva M, Penin A, Sogame Y, Cornette R. et al. (5名) (2018) Cooption of heat shock regulatory system for anhydrobiosis in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki*. **PNAS** 5: E2477-E2486. DOI:10.1073/pnas.1719493115 (査読有り)
3. Cornette R. et al. (9名) (2017) A new anhydrobiotic midge from Malawi, *Polypedilum pembai* sp. nov. (Diptera: Chironomidae), closely related to the desiccation tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki* Hinton. **Systematic Entomology** 42: 814-825. DOI:10.1111/syen.12248 (査読有り)
4. Kikuta S, Watanabe SJ, Sato R, Gusev O, Nesmelov A, Sogame Y, Cornette R. Kikawada T (2017) Towards water-free biobanks: long-term dry preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells. **Scientific Reports** 7(1): 6540. DOI:10.1038/s41598-017-06945-y (査読有り)
5. Cornette R. (2017) 極限的な乾燥耐性を示す生物から未来の技術を学ぶ. **Agricultural Biotechnology** 1(3):229-234 (査読無し)
6. Ryabova A, Mukae K, Cherkasov A, Cornette R. et al. (5名) (2016) Genetic background of enhanced radioresistance in an anhydrobiotic insect: transcriptional response to ionizing radiations and desiccation. **Extremophiles** 21:109-120. DOI:10.1007/s00792-016-0888-9 (査読有り)
7. Sogame Y, Okada J, Kikuta S, Miyata Y, Cornette R. Gusev O, Kikawada T. (2016) Establishment of gene transfer and gene silencing methods in a desiccation-tolerant cell line, Pv11. **Extremophiles**. 21:65-72. DOI:10.1007/s00792-016-0880-4 (査読有り)

〔学会発表〕(計11件)

1. Cornette R. (2019) ネムリユスリカにおける乾燥休眠の誘導メカニズムについて. **第63回日本応用動物昆虫学会大会 講演要旨集** 97 2019年3月25日~2019年3月27日 筑波大学(茨城県つくば市)
2. 片山玲大 (2019) ネムリユスリカの乾燥誘導性プロモーターを利用した耐性誘導メカニズム

の解明. **第 63 回日本応用動物昆虫学会大会 講演要旨集** 124 2019年3月25日
～2019年3月27日 筑波大学(茨城県つくば市)

3. Cornette R. (2018) New insights about anhydrobiosis in *Polypedilum vanderplanki* (Diptera, Chironomidae) from metabolome analysis. **The 55th annual meeting of the society for cryobiology CRYO2018, Abstracts 27.** 2018年7月10日～2018年7月13日
(Madrid, スペイン)
4. Cornette R. (2018) ネムリユスリカの乾燥耐性に関連したメタボローム解析. **第29回ユスリカ研究集会** 2018年5月26日～2018年5月27日 (広島県竹原市)
5. Cornette R. (2018) メタボローム解析から見てきたネムリユスリカの乾燥幼虫の蘇生メカニズム. **第62回日本応用動物昆虫学会大会 講演要旨集** 91 2018年3月25日～2018年3月27日 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
6. Cornette R. (2017) 乾燥休眠(anhydrobiosis)を示すマラウイ産ネムリユスリカの新種について. **第18回極限環境生物学会年会要旨 22.** 2017年11月11日～2017年11月12日 産業技術総合研究所(茨城県つくば市)
7. Cornette R. (2017) A new anhydrobiotic midge from Malawi, *Polypedilum pembai* sp. nov. (Diptera: Chironomidae), closely related to the desiccation tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki* Hinton. **20th International Symposium on Chironomidae - Abstract book** 66. 2017年7月2日～2017年7月8日 (Trento, Italy)
8. Cornette R. マラウイから発見されたネムリユスリカの新種について. **第61回日本応用動物昆虫学会大会.** 2017年3月27日～29日. 東京農工大学 (東京都、小金井市)
9. Cornette R. カラカラに乾燥しても死なないネムリユスリカにおける乾燥誘導性プロモーターの特定. **第17回極限環境生物学会年会.** 2016年11月25日～26日. 東京工業大学 (神奈川県、横浜市)
10. Cornette R. Deciphering the mechanism of desiccation tolerance in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. **The 22nd International Congress of Zoology.** 2016年11月14日～19日. OIST (沖縄県、恩納村)
11. Cornette R. Functional analyses on the mechanism of induction of anhydrobiosis in the midge *Polypedilum vanderplanki*. **The Tenth international Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology.** 2016年8月29日～2016年9月2日 (Novosibirsk, Russia)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

(2) 研究協力者 該当なし

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。