

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15073

研究課題名(和文) 乾燥・塩ストレス制御型タンパク質発現システムの開発

研究課題名(英文) Development of novel desiccation and salinity-inducible expression systems

研究代表者

黄川田 隆洋 (Kikawada, Takahiro)

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：60414900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、極限乾燥耐性生物であるネムリユスリカがもつ乾燥・塩によって発現調節される遺伝子のプロモーターとその制御因子を同定することを基盤として、新規な乾燥・塩ストレス制御型タンパク質発現システムを開発することを目的とした。H28年度は、研究の手始めとして、ポジティブコントロールとして用いる事ができる恒常発現プロモーター(PvGapdhプロモーター)を単離した。H29年度は、乾燥誘導性遺伝子の多くに特異的なDNAモチーフ(TCTAGAA)が存在し、そこに結合する転写因子としてPvHSF1を同定した。RNAi実験により、PvHSF1がPv11細胞の乾燥耐性誘導に関与している事が証明された。

研究成果の概要(英文)：Our final goal of this project is to develop a novel heterologous gene expression system based on dry- and salinity-inducible promoters in the anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*. In 2016, the promoter region for PvGapdh gene was identified as a novel constitutive promoter, which allowed effectively expressing heterologous proteins, such as GFP, in Pv11 cells, a cultured cell line derived from the anhydrobiotic insect. In 2017, we found a highly conserved motif (TCTAGAA) in the promoter regions for several desiccation-inducible genes in the insect, which motif was corresponded with *Drosophila*'s heat shock element (HSE). RNAi experiments demonstrated that PvHSF1, a homolog for the HSE-binding protein in the anhydrobiotic insect, could be involved in induction of the extreme desiccation tolerance in Pv11 cells.

研究分野：極限環境生物学

キーワード：遺伝子発現 プロモーター 乾燥耐性

1. 研究開始当初の背景

ネムリユスリカは、脱水が進行し代謝が停止しても死に至ることなく、再水和させると代謝が復活する。この極限乾燥耐性の分子機構を解析する過程で、耐性に関連する様々な遺伝子を同定し(Cornette & Kikawada, 2011)、最近ではそのゲノム構造まで明らかにした(Gusev et al., 2014)。これら一連の解析から、乾燥による遺伝子発現制御が、塩(1%NaCl)添加によっても作動することが示された(図1)。

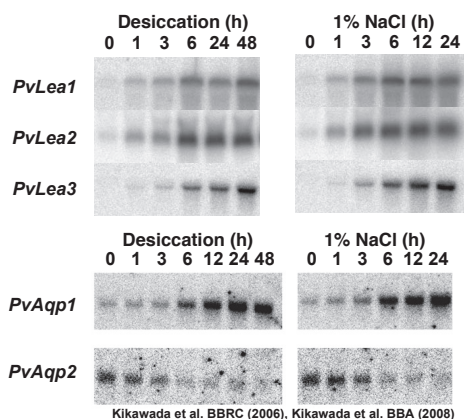


図1. ネムリユスリカの乾燥・塩誘導性遺伝子の発現パターン

例えば、シャペロン様活性をもつ LEA タンパク質遺伝子 (*PvLea1-3*) は、乾燥と同様に塩の添加によって処理後1時間程度で発現が上昇し始める。脱水速度の制御因子であるアクアポリンは、乾燥誘導型の *PvAqp1* が塩添加でも乾燥時と同様に処理後6時間で発現が上昇する一方、乾燥抑制型の *PvAqp2* は塩添加でも発現が低下する。これらのことから、ネムリユスリカには乾燥と塩処理に共通する遺伝子発現調節機構の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究は、極限乾燥耐性生物であるネムリユスリカがもつ乾燥・塩によって発現調節される遺伝子のプロモーターとその制御因子を同定することを基盤として、新規な乾燥・塩ストレス制御型タンパク質発現システムの開発を目的とする。

3. 研究の方法

乾燥および塩ストレス下の Pv11 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、発現上昇(または低下)する遺伝子のうち発現変動比率の高いものを選抜する。理研が開発した CAGE 法によって、発現プロファイルの確認とプロモーター領域の同定を行う。最終的に、Pv11 細胞を用いて、外来性遺伝子が発現可能になるかどうかの機能解析を行う。

4. 研究成果

H28 年度は、研究の手始めとして、ポジティブコントロールとして用いる事ができる恒常発現プロモーターを単離した。ゲノム解析の過程で、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (*PvGadh*) は、ネムリユスリカの培養細胞 (Pv11) で恒常的に高発現している遺伝子の一つであることがわかっていった (Gusev et al., 2014)。この *PvGadh* プロモーターを使った発現ベクター (pPGK) を構築した。このベクターを利用することで、GFP や RFP といった蛍光タンパク質を Pv11 細胞に発現させることに成功した。ちなみに、ショウジョウバエやカイコで用いられている市販の発現ベクターでは、Pv11 細胞に GFP を発現できない。本研究で得られた pPGK ベクターを用いることで、GFP 以外にもルシフェラーゼや Cas9 スクレアーゼなど多様な遺伝子を Pv11 細胞に発現させることが可能となった。

H29 年度は、乾燥誘導性遺伝子発現を制御する転写因子として *PvHSF1* を同定した。ネムリユスリカとその近縁で乾燥耐性がないヤモンユスリカのゲノムの比較から、ネムリユスリカでは乾燥で発現が上昇する遺伝子の転写開始点近傍に、ゲノム特異的な DNA モチーフ (TCTAGAA) が多く、かつ偏って存在すること、プロモーター領域に TCTAGAA を持つ乾燥誘導性遺伝子には乾燥耐性関連遺伝子が多く含まれることを見いだした。また、TCTAGAA はショウジョウバ

エの HSF1 の結合領域に酷似していた。そこで、ネムリユスリカの培養細胞 (Pv11 細胞) を用いて、*PvHsf1* 遺伝子を機能抑制したところ、乾燥耐性関連遺伝子の発現が減少した。さらに、*PvHsf1* の発現を抑制した Pv11 細胞を乾燥させると、通常の Pv11 細胞を乾燥させたもの比べて、再び水に浸けた後の生存率が低下した。すなわち、PvHSF1 が乾燥耐性を制御する重要な転写因子であることが明らかとなった。これらのことから、ネムリユスリカは進化の過程で、熱ストレス応答性の遺伝子発現制御ネットワークを転用化 (co-option) した結果、極限的な乾燥耐性を発揮するようになった可能性が示された。RNAi 実験により、PvHSF1 が Pv11 細胞の乾燥耐性誘導に関与している事が証明された (図 2)。

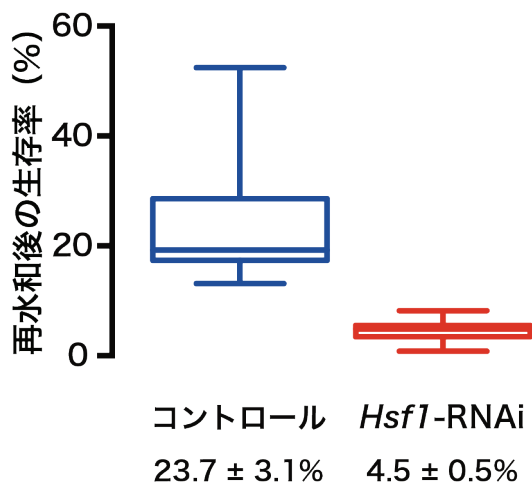


図 2. *PvHsf1* 遺伝子を抑制した Pv11 細胞の再水和後生存率 (Mazin et al., PNAS, 2018 を改変)

<引用文献>

1. Cornette, R & Kikawada, T., *IUBMB Life*, 63:419-428, 2011
2. Gusev, O., et al., *Nat Commun*, 5:4784, 2014
3. Kikawada, T., et al., *Biochim Biophys Acta*, 1778:514-520, 2008
4. Kikawada, T., et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 348:56-61. 2006

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① Mazin, P. V., Shagimardanova, E., Kozlova, O., Cherkasov, A., Sutormin, R., Stepanova, V. V., Stupnikov, A., Logacheva, M., Penin, A., Sogame, Y., Cornette, R., Tokumoto, S., Miyata, Y., Kikawada, T., Gelfand, M. S., Gusev, O., *Proc Natl Acad Sci USA*, 115: E2477-E2486, 2018, DOI: 10.1073/pnas.1719493115 (査読有)
- ② Kikuta, S., Watanabe, S. J., Sato, R., Gusev, O., Nesmelov, A., Sogame, Y., Cornette, R., Kikawada, T., *Sci Rep*, 7:6540 2018, DOI: 10.1038/s41598-017-06945-y (査読有)
- ③ Sogame, Y., Okada, J., Kikuta, S., Miyata, Y., Cornette, R., Gusev, O., and Kikawada, T. *Extremophiles*, 21: 65-72 2017, DOI: 10.1007/s00792-016-0880-4 (査読有)
- ④ Ryabova, A., Mukae, K., Cherkasov A., Cornette, R., Shagimardanova, E., Sakashita, T., Okuda, T., Kikawada, T., and Gusev, O. *Extremophiles*, 21: 109-120, 2017, DOI: 10.1007/s00792-016-0888-9 (査読有)
- ⑤ Sogame, Y., and Kikawada, T. *Curr Opin Insect Sci*, 19: 16-21, 2017, DOI: 10.1016/j.cois.2016.10.008 (査読有)
- ⑥ 十亀陽一郎, 黄川田隆洋 *化学と生物* 54: 248-253, 2017, DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.54.248 (査読有)

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ① 徳本翔子, 宮田佑吾, Deviatiiarov, R., Gusev, O., 黄川田隆洋. Hsf の選択的スプライシングによるネムリユスリカ特異的な乾燥耐性制御機構の解明. **2017年度 生命科学系学会合同年次大会, 第40回日本分子生物学会年会**. 兵庫県 (神戸ポートアイランド) 2017/12
- ② 黄川田隆洋, 菊田真吾, 渡辺俊介, 佐藤

- 令一, Gusev, O., Nesmelov, A., 十亀陽一郎, コルネット リシャー. Toward water-free biobanks: long-term dry-preservation of desiccation sensitive enzyme in the anhydrobiotic insect cells. **2017年度生命科学系学会合同年次大会, 第40回日本分子生物学会年会.** 兵庫県 (神戸ポートアイランド) 2017/12
- ③ 徳本翔子, 宮田佑吾, 十亀陽一郎, 黄川田隆洋. ネムリユスリカにおける新規プロモーターの同定とその応用. **2017年度 極限環境生物学会.** 茨城県 (産総研) 2017/11
- ④ 黄川田隆洋. 水の無い環境で死なないための生命戦略: ネムリユスリカの極限乾燥耐性. **日本動物学会第88回富山大会.** 富山県 (富山県民会館) 2017/9 (招待講演)
- ⑤ Kikawada, T., Impact of anhydrobiotic midge research in the area of cells preservation. **Life of Genome 2017.** カザン (ロシア) 2017/9 (招待講演)
- ⑥ 黄川田隆洋, 宮田 佑吾, 十亀 陽一郎, Cornette, R., Gusev O., 極限乾燥耐性研究のモデル生物としてのネムリユスリカ. **第39回日本分子生物学会年会.** 横浜市 (パシフィコ横浜) 2016/12 (招待講演)
- ⑦ Kikawada, T., Molecular mechanisms underlying anhydrobiosis, the ametabolic suspended animation, in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki*. **The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology (ICZ) & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan (ZSJ).** 沖縄県 (OIST) 2016/11 (招待講演) (国際学会)
- ⑧ 黄川田隆洋. ネムリユスリカの耐性機構を応用した常温乾燥保存技術開発の可能性. **Cryopreservation Conference 2016.** 愛知県 (基礎生物学研究所) 2016/11 (招待講演)
- ⑨ Kikawada, T., Cornette, R., Gusev, O., Current knowledge of anhydrobiosis in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki*. **ICE 2016 XXV International Congress of Entomology.** オランダ (アメリカ) 2016/9 (国際学会)
- ⑩ Kikawada, T., Molecular mechanisms underlying the extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic insect *Polypedilum vanderplanki*. **Extremophiles 2016, 11th International Congress of Extremophiles.** 京都府 (京都大学) 2016/9 (招待講演) (国際学会)
- ⑪ 黄川田隆洋. なぜ乾いても死なない?? ネムリユスリカの乾燥耐性機構の獲得と進化? **日本遺伝学会第88回大会.** 静岡県 (日本大学三島キャンパス) 2016/9 (招待講演)
- ⑫ Kikawada, T., Miyata, S., Sogame, Y., Furusawa, T., Kikuta, S., Cornette, R., Gusev, O., The first edition of mutagenesis by CRISPR/Ca in the extreme desiccation tolerant cell. **The tenth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology.** ノボシビルスク (ロシア) 2016/8 (招待講演) (国際学会)
- ⑬ 黄川田隆洋. 極限環境耐性機構のオミクス解析: どこまでネムリユスリカの秘密は解き明かされたのか. **第61回低温生物工学会セミナー及び年会.** 埼玉県 (東京電機大学 鳩山キャンパス) 2016/6 (招待講演)

6. 研究組織

(1)研究代表者

黄川田 隆洋 (KIKAWADA, Takahiro)
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 新産業
開拓研究領域・上級研究員
研究者番号：60414900

(2)連携研究者

グセフ オレグ (Gusev, Oleg)
国立研究開発法人理化学研究所 予防医
療・診断技術開発プログラム・研究プログ
ラムマネージャー
研究者番号：30711999

(3)研究協力者

コルネット リシャー (Cornette, Richard)
宮田 佑吾 (Miyata, Yugo)
十亀 陽一郎 (Sogame, Yoichiro)
徳本 翔子 (Tokumoto, Shoko)