

令和元年6月28日現在

機関番号：51601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18827

研究課題名(和文) ネムリユスリカ培養細胞を用いた多細胞生物における無代謝休眠の分子機構解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanism of anhydrobiosis by using culture cell of aleeping chironomid

研究代表者

十亀 陽一郎 (Sogame, Yoichiro)

福島工業高等専門学校・化学・バイオ工学科・助教

研究者番号：60769850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ネムリユスリカの培養細胞を用い、多細胞生物における無代謝休眠の分子機構解明を行った。研究期間1年目では、ネムリユスリカの培養細胞で分子生物学技術が使用できるように手法の確立を行った。2年目からはネムリユスリカの細胞で働くプロモーターの探索と単離を行った。所属機関を移動後は、単細胞生物を用い、より単純な実験系で無代謝休眠の分子機構解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無代謝休眠は、極限環境などに生息する特殊な生物に見られる生命現象である。無代謝休眠の状態では、代謝は停止している一方、乾燥をはじめ様々な環境ストレスに対する耐性を有している。この現象の分子機構解明は、生命現象の仕組みの追求だけにとどまらず、生物や通常乾燥保存できないような物質の保存など様々な分野で応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the molecular mechanisms for anhydrobiosis were researched by using culture cells of sleeping chironomid. First stage, experiment techniques were established in the cells. In second stage, promoter which function in the cells was identified. After the movement of institute, investigation of molecular mechanisms by using single cell animal was performed.

研究分野：生理学

キーワード：無代謝休眠

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

1. 研究開始当初の背景

アフリカの半乾燥地帯に生息するネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) の幼虫は、水が枯渇してカラカラに干からびても再び吸水すれば何事もなかったかのように蘇る乾燥無代謝休眠の能力を獲得している。この能力は本当に驚異的で、乾燥状態では、絶対 0 度から 90 度までの高低高温、無酸素状態、有機溶媒など様々な環境ストレスに対する耐性を有し、宇宙空間に 2 年以上放置しても水戻しすれば蘇る。この現象とネムリユスリカは 1951 年に記載されたが⁽¹⁾、生息地の内政不安と継代飼育の難しさから、その後研究を継続したものはなかった。一方、申請者らの研究室 (学振 PD 受け入れ先) では、2000 年に室内におけるネムリユスリカの継代飼育に成功して以来、生体成分を保護するために無代謝休眠の際に大量に合成されるトレハロースや発現が上昇する LEA タンパク質など、乾燥耐性獲得に直接的に関わる因子の同定と機能解析を世界に先駆けて行い^(2,3,4)、ゲノム情報も解読した⁽³⁾。しかしながら、これらの因子をコントロールする遺伝子の転写因子などシグナル伝達系ネットワークを含めた制御機構は全く明らかになっていない。これは、ネムリユスリカなどの多細胞生物では、生体を用いた遺伝子導入や破壊の実験系が困難であることに起因する。しかしながら、ネムリユスリカの無代謝休眠の場合、脳や神経系は関与せず細胞レベルで制御されており⁽²⁾、細胞レベルでの解析が可能である。そこで本研究では、近年申請者の所属する研究室でネムリユスリカから樹立させた培養細胞 Pv11⁽⁵⁾ が幼虫体と同じく無代謝休眠の能力を発揮できることを証明した上で、多細胞生物の細胞レベルにおける無代謝休眠の分子機構を明らかにすることを目的とする。

1) Hinton (1951) *Proc. Zool. Soc. Lond.* (2) Watanabe et al. (2002) *J. Exp. Biol.* (3) Gusev et al. (2014) *Nat. Commun.* (4) Hatanaka et al. (2013) *Insect Biochem. Mol. Biol.* (5) Nakahara et al. (2010) *Cryobiology*.

2. 研究の目的

本研究では、Pv11 の無代謝休眠の過程において発現変化するタンパク質を手がかりとして、乾燥に応答するタンパク質 (遺伝子) とそれらの作用機構 (シグナル伝達系ネットワーク) を明らかにする。

また、所属機関異動後は、設備上の問題などから単細胞生物を用いた無代謝休眠のシグナル伝達系や環境ストレス耐性について明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

ネムリユスリカの培養細胞を用いた研究では、デリーションクローンアッセイとフローサイトメトリー解析により、培養細胞で発現可能なプロモーターの解析を行った。

単細胞生物を用いた無代謝休眠の耐性獲得機構、シグナル伝達系の解析では、生理学的解析や共焦点レーザー顕微鏡を用いた形態解析を行った。

4 . 研究成果

ネムリユスリカ培養細胞で発現可能なプロモーターの取得に成功した。本成果は、Scientific Reports や Extremophiles で成果発表を行った。

単細胞生物の無代謝休眠の過程において、放射線耐性があることを明らかにした。本研究においては、論文の投稿準備中である。

5 . 主な発表論文等

主な発表論文

1. Identification of a Novel Strong Promoter from the Anhydrobiotic Midge, *Polypedilum vanderplanki*, with Conserved Function in Various Insect Cell Lines

Miyata Y.*, Tokumoto S.*, Sogame Y.*, (equal contribution) Deviatiiarov R., Okada J., Cornette R., Gusev O., Shagimardanova E , Sakurai M., Kikawada T

Scientific Reports 9 7004 2019 年

2. Co-option of heat shock regulatory system for anhydrobiosis in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki*

Pavel V Mazin, Elena Shagimardanova, Olga Kozlova, Alexander Cherkasov, Roman Sutormin, Vita Stupnikov, Maria Logacheva, Aleksey Penin, Yoichiro Sogame, Richard Cornette, Shoko Tokumoto, Yugo Miyata, Takahiro Kikawada, Mikhail Gelfand, Oleg Gusev

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 115(10) 2477-2486 2018 年 3 月

3. Towards water-free biobanks: long-term dry-preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells

Kikuta S, Watanabe J S, Sato R, Gusev O, Nesselov A, Sogame Y, Cornette R, Kikawada T
Scientific Reports 7(1) 6540 2017年7月

4.Current findings on the molecular mechanisms underlying anhydrobiosis in *Polypridium vanderplanki*. Sogame Y, Kikawada T

Current Opinion in Insect Science 19 16-21 2017年2月

5.Establishment of gene transfer and gene silencing methods in a desiccation-tolerant cell line, Pv11.

Sogame Y, Okada J, Kikuta S, Miyata Y, Cornette R, Gusev O, Kikawada T

Extremophiles : life under extreme conditions 21 65-72 2017年1月

6.Morphogenetic and molecular analyses of cyst wall components in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus* Nag-1.

Funadani R*, Sogame Y*, (* equal contributor) Kojima K, Takeshita T, Yamamoto K, Tsujizono T, Suizu F, Miyata S, Yagyu KI, Suzuki T, Arikawa M, Matsuoka T

FEMS microbiology letters 363(18) 2016年9月

7.EF-1 silencing by feeding RNAi suppresses resting cyst formation in *Colpoda cucullus* Nag-1 strain

Y. Sogame, M. Hori, T. Matsuoka

Invertebrate Survival Journal 13 89-93 2016年1月

〔雑誌論文〕(計 10 件)

〔学会発表〕(計 39 件)

〔図書〕(計 0 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〕

ホームページ等

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：黄川田隆洋

ローマ字氏名：Kikawada Takahiro

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。