

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21688004

研究課題名（和文） 乾燥無代謝休眠覚醒過程に特異的な生体分子修復系の分子背景の解明

研究課題名（英文） Molecular background underlying reviving step of anhydrobiosis

研究代表者

黄川田 隆洋 (KIKAWADA TAKAHIRO)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：60414900

研究成果の概要（和文）：本課題では、ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠の覚醒過程で特異的な修復機構の存在を検討した。マイクロアレイ解析の結果、400 個以上の遺伝子が再水和過程で特異的に発現上昇することが分かった。乾燥から再水和に至る過程は著しい酸化ストレスに曝される過程であり、その結果 DNA やタンパク質は傷害を受ける。PIMT (protein L-isoaspartyl methyltransferase) と呼ばれる異性化タンパク質修復酵素や Rad51 などの DNA 修復酵素が再水和過程で発現することで、健全な蘇生が実現できるのであろう。

研究成果の概要（英文）：We investigated molecular mechanisms underlying reparation systems during rehydration process of anhydrobiosis in the sleeping chironomid. From microarray analysis, expressions of over 400 genes were specifically up-regulated in the process of rehydration. The process of desiccation and rehydration in anhydrobiosis should cause serious oxidative stress in the sleeping chironomid, so that their genomic DNAs and proteins must be injured during anhydrobiosis. During rehydration, expression of reparation enzymes for DNA and proteins, such as Rad51 and protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT), may lead to successful resurrection from desiccated form.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	20,800,000	6,240,000	27,040,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、ストレス、修復、遺伝子、乾燥耐性

1. 研究開始当初の背景

生物にとって、水は代謝を動かす溶媒として必須である。細胞から水分が失われていくと代謝は停止し、最終的には死に至る。しかし、一部の生物は、完全に乾燥して代謝が停止しても死に至ることなく、再給水すると代謝が復活する。この現象は乾燥無代謝休眠と

呼ばれ、昆虫ではネムリユスリカの幼虫のみに認められる。いったん乾燥無代謝休眠状態になったネムリユスリカは、半永久的に代謝を停止させることが可能である。しかも、水とさせるだけで、約 1 時間でネムリユスリカ幼虫は、乾燥無代謝休眠から覚醒し、発育を再開する。

研究開始当初は、乾燥過程で作動する機構解明が中心であり、再水和によって引き起こされる覚醒過程の研究は未着手であった。

2. 研究の目的

ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠からの覚醒に決定的な役割を果たしていると考えられる生体分子修復過程の分子的背景を明らかにする。

3. 研究の方法

吸水過程のネムリユスリカをもちいて cDNA ライブラリーを作製し、その配列をデータベース化した。具体的には、乾燥幼虫(吸水 0 時間)、吸水 1 時間及び吸水 24 時間の幼虫を用いた。同時に、発現産物のカタログ化を行う目的で、乾燥過程及び吸水過程などの様々な処理を施した幼虫から抽出した RNA を混合し、平均化ライブラリーを作製した。得られたデータベースから独立したクラスターを抽出するために、Blastx に基づく再クラスタリングを施した。カスタムマイクロアレイを作製するために、得られたクラスターデータを元に、独立した遺伝子をコードするプローブを選抜した。最終的に、16,652 個のプローブを選抜し、アジレント社製の 4 x 44k フォーマットのアレイを作製し、遺伝子発現解析に利用した。

4. 研究成果

(1) ネムリユスリカマイクロアレイ解析

無処理区(D 0h)と比較して、4 倍以上の遺伝子発現変動を十分な変化と見なし、解析を行なった。D 24h、D 48h、R 24h のうち少なくとも 1 処理区で 4 倍以上発現変動した遺伝子は、16,652 個の遺伝子の内、4,412 個(26%)あった(図 1)。乾燥/吸水処理により著しく発現変動した遺伝子が多数存在することが明らかとなった。Gene ontology に基づいて分

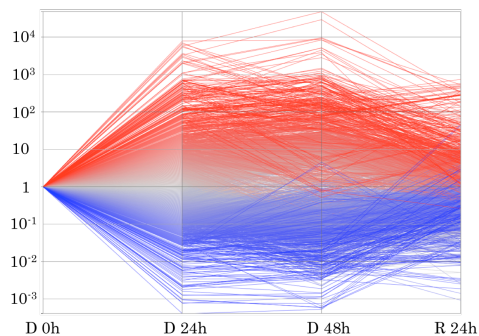


図 1. 乾燥/再水和処理時の遺伝子発現プロフィール

類すると、D 24h には 774 個、D 48h には 1,977 個、および R 24h には 428 個のプローブが発現誘導性を示していた。

詳しく言えば、上位から順に、D 24h では「ストレス関連 (6.6%)」、「輸送系 (3.4%)」、「抗酸化関連 (3.1%)」、「脂質代謝 (2.3%)」、「核酸合成 (1.7%)」であり、D 48h では「ストレス関連 (5.0%)」、「輸送系 (4.3%)」、「タンパク質分解 (2.7%)」、「タンパク質フォールディング (2.4%)」、「核酸合成 (2.4%)」に関連した遺伝子が発現していた。また、R 24h は「ストレス関連 (7.7%)」、「タンパク質分解 (4.9%)」、「輸送系 (2.3%)」、「脂質代謝 (1.6%)」、「核酸合成 (1.5%)」に関連した遺伝子が発現していた。

(2) タンパク質修復酵素の存在

マイクロアレイ解析と EST データベースを組み合わせることで、13 個の独立した異性化タンパク質修復酵素 PIMT (protein L-isospartyl methyltransferase) 遺伝子を見いだした。加えて、ゲノム解析と mRNA-seq から新たに 2 個の PIMT 遺伝子も発見した。

PIMT は、老化に伴うタンパク質のアスパラギン残基やアスパラギン酸残基の異性化を防ぐことで、タンパク質の健全性を維持する機能を持った酵素である。PIMT は、微生物から植物・動物まで広く存在しているが、そのコピー数は半数体当たり 1 つないし 2 つしか存在しない。15 個もの PIMT のパラログを有する生物は、知る限りネムリユスリカのみである。いくつかの PIMT 遺伝子パラログは乾燥に伴って発現が上昇し、再水和過程でも発現が持続していた。この結果から、多コピーかつ乾燥誘導性の PIMT 遺伝子の発現によって、乾燥や再水和によって生じる活性酸素濃度の上昇がもたらす深刻な異性化から、健全性を維持するようにタンパク質を修復することで、anhydrobiosis に至る乾燥過程や再水和過程でも生体内の様々な機能を保持し続けることを可能としていると考えられた。

(3) 再水和時のゲノム DNA の損傷と修復

再水和過程での DNA 修復系の検討も進めた。再水和過程は著しい酸化ストレスに曝される過程であり、その結果 DNA が損傷を受けていた。この損傷に対する修復系や活性酸素の除去系が、再水和に伴って作動することが、乾燥無代謝休眠からの健全な覚醒に重要で

あることが明らかとなった(図2)。同時に、この過程には、Rad51のような複数のDNA修復酵素遺伝子が関与していることも明らかになった。

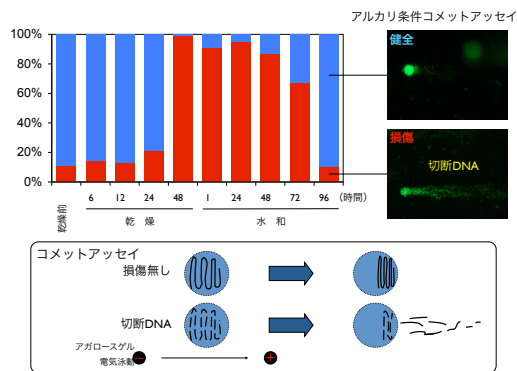


図2. 乾燥時にゲノムDNAは傷害を受け、再水中に修復される

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 19 件)

- Mukae K, Gusev O, Hatanaka R, Cornette R, Okuda T, Kikawada T (2012) Wide overlap in mRNA transcription response to desiccation or oxidative stress in larvae of the cryptobiotic insect. *Cryobiol Cryotech* 58 191-194 (査読有)
- Mukae K, Cornette R, Gusev O, Hatanaka R, Okuda T, Kikawada T (2012) Elucidation of mechanisms underlying desiccation tolerance with exhaustive gene analysis. *Cryobiol Cryotech* 58 73-76 (査読有)
- 菊田真吾, 畑中理恵, 黄川田隆洋 (2012) 極限環境に生きる昆虫ネムリユスリカの生存戦略. *生物科学* 63 195-204 (査読無)
- Cornette R, Kikawada T (2011) The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: Current status of our knowledge. *IUBMB Life* 63 419-429 doi: 10.1002/iub.463 (査読有)
- 畑中理恵, 薦田(萩原)優香, 金森保志, 藤田弥佳, コルネット・リシャー, 奥田隆, 黄川田隆洋 (2011) ネムリユスリカ LEAタンパク質 (PvLEA4) の機能解析. *Cryobiol Cryotech* 57 135-138 (査読有)
- Kikawada T (2011) Mechanisms underpinning induction of anhydrobiosis in *Polypedilum vanderplanki*. *Cryobiol Cryotech* 57 33-43 (査読無)
- 畑中理恵, 古木隆生, 櫻井実, 黄川田隆洋 (2011) ネムリユスリカ由来の細胞保護タンパク質の機能と低分子ペプチドによる代替. *バイオインダストリー* 28 43-48 (査読無)
- Gusev O, Cornette R, Kikawada T, Okuda T (2011) Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedilum vanderplanki*. *Cell Stress Chaperones* 16 81-90 doi: 10.1007/s12192-010-0223-9 (査読有)
- Gusev O, Nakahara Y, Vanyagina V, Malutina L, Cornette R, Sakashita T, Hamada N, Kikawada T, Kobayashi Y, Okuda T (2010) Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: Linkage with radioresistance. *PLoS ONE* 5 e14008 doi: 10.1371/journal.pone.0014008 (査読有)
- Cornette R, Kanamori Y, Watanabe M, Nakahara Y, Gusev O, Mitsumasu K, Kadono-Okuda K, Shimomura M, Mita K, Kikawada T, Okuda T Identification of anhydrobiosis-related genes from an expressed sequence tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (diptera; chironomidae). *J Biol Chem* 285 35889-35899 doi: 10.1074/jbc.M110.150623 (査読有)
- Mitsumasu K, Kanamori Y, Fujita M, Iwata K, Tanaka D, Kikuta S, Watanabe M, Cornette R, Okuda T, Kikawada T Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *FEBS J* 277 4215-4228 doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07811.x (査読有)

12. コルネット・リシャー, 黄川田隆洋 (2010) ネムリユスリカの極限乾燥耐性 (アンヒドロビオシス). *バイオサイエンスとインダストリー* 68 178-184 (査読無)
 13. Nakahara Y, Imanishi S, Mitsumasu K, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, Kikawada T, Okuda T (2010) Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation. *Cryobiology* 60 138-146 doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.10.004 (査読有)
 14. 黄川田隆洋 (2009) ネムリユスリカの乾燥耐性—アンヒドロビオシス—の分子機構. *比較内分泌学* 35 98-106 (査読無)
- 他 5 件

〔学会発表〕 (計 61 件)

1. 黄川田隆洋, Gusev O, Cornette R, 末次克行 (2013) ネムリユスリカのゲノム解析から見えてきた乾燥無代謝休眠の分子機構. (招待講演) **第57回日本応用動物昆虫学会大会** 2013年03月29日 藤沢、神奈川
2. 黄川田隆洋, グセフ オレグ, コルネット リシャー, 末次克行 (2012) ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠を支えるゲノム情報. **第35回日本分子生物学会年会** 2012年12月12日 福岡
3. Kikawada T, Gusev O, Suetsugu Y, Cornette R, Okuda T (2012) Comparative genomics for understanding how to survive under extreme desiccation conditions. (招待講演) **The Third International Scientific and Practical Conference: Postgenomic Methods of Analysis in Biology, and Laboratory and Clinical Medicine** 2012年11月24日 カザニ、ロシア
4. 黄川田隆洋 (2012) メタボローム解析からみたネムリユスリカの乾燥耐性におけるトレハロースの役割 (招待講演) **第16回トレハロースシンポジウム** 2012年10月25日 東京
5. 黄川田隆洋 (2012) ネムリユスリカの極限乾燥耐性機構の分子基盤. (招待講演)

第57回低温生物工学会年会 2012年06月01日 つくば

6. Kikawada T, Gusev O, Cornette R, Okuda T (2012) The sleeping chironomid genome project toward understanding molecular context underlying the extreme desiccation tolerance, anhydrobiosis. (招待講演) **International symposium of NODAI genome research center, Genome Research, Current challenges and Future directions** 2012年1月21日 東京
7. Kikawada T, Cornette R, Gusev O, Suetsugu Y, Mukae K, Kikuta S, Hatanaka R, Shimura S, Satoh N, Okuda T (2011) Anhydrobiomics research of the sleeping chironomid: toward a comprehensive understanding the molecular context underlying extreme desiccation tolerance. **4th International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants** 2011年7月18日 レンヌ、フランス
8. 黄川田隆洋, Cornette R, Gusev O, 末次克行, 菊田真吾, 迎恭輔, 畑中理恵, 志村幸子, 佐藤矩行, 奥田隆 (2011) 極限乾燥耐性の分子メカニズム理解に向けたネムリユスリカ anhydrobiomics. **第56回低温生物工学会年会セミナー及び年会** 2011年7月8日 盛岡
9. 黄川田隆洋 (2011) ネムリユスリカの極限乾燥耐性 (anhydrobiosis) を支える分子機構 (招待講演) **日本農芸化学会2011年度大会** 2011年3月25日 京都
10. 黄川田隆洋 (2010) ネムリユスリカの極限乾燥耐性機構 (招待講演) **47th CRC Seminar** 2010年12月16日 盛岡
11. Hatanaka R, Hagiwara-Komoda Y, Kanamori Y, Fujita M, Okuda T, Kikawada T (2010) Molecular cloning and characterization of a novel LEA protein in an anhydrobiosis insect, *Polypedilum vanderplanki*. *Cryobiology* 2010 2010年7月18日 ブリストル、イギリス
12. 黄川田隆洋 (2010) ネムリユスリカの極限乾燥耐性の分子機構. **第9回バイオテクノロジー国際会議, バイオアカ**

- デミックフォーラム 2010年7月1日
東京
13. 黄川田隆洋 (2010) ネムリユスリカの乾燥耐性と応答機構. **第55回低温生物工学会年会セミナー** 2010年6月25日 東京
 14. 黄川田隆洋、奥田隆 (2010) ネムリユスリカの極限乾燥耐性 (招待講演) **第54回日本応用動物昆虫学会大会** 2010年3月27日 千葉
 15. 黄川田隆洋 (2009) ネムリユスリカの極限乾燥耐性を支える分子基盤の解明. **極限環境微生物学会2009年度 (第10回) 年会** 2009年10月29日 東京
 16. 中原雄一, 今西重雄, 光増可奈子, 金森保志, 岩田健一, 渡邊匡彦, 黄川田隆洋, 奥田隆 (2009) 乾燥耐性を持つ動物培細胞の作出. **極限環境微生物学会2009年度 (第10回) 年会** 2009年10月29日 東京
 17. Mitsumasu K, Kanamori Y, Fujita M, Iwata K, Tanaka D, Watanabe M, Kikawada T, Okuda T (2009) Regulation of trehalose metabolism underlying rapid accumulation of trehalose in the desiccating larvae of the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. **3rd International Symposium on the Environmental Physiology of Ectotherms and Plants** 2009年8月24日 つくば
 18. Okuda T, Kikawada T, Sakurai M, Furuki T, Akao K, Nakahara Y, Oleg G, Saito A, Watanabe M, Iwata K, Kanamori Y, Cornette R (2009) Life without water: Anhydrobiosis in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. **46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology** 2009年7月20日 札幌
 19. 黄川田隆洋 (2009) ネムリユスリカの極限的な乾燥耐性の仕組みをさぐる (招待講演) 日本大学 文理学部 総合文化研究室・自然科学研究所シンポジウム『動物の不思議を科学する』 2009年6月20日 東京
 20. 黄川田隆洋 (2009) 乾燥耐性生物ネム

リユスリカの不思議な世界 (招待講演)
極限環境微生物学会第10回シンポジウム 2009年6月9日 東京
他 41 件

〔図書〕 (計 1 件)

1. 薦田 (萩原) 優香, 黄川田隆洋 (2010) **昆虫の低温耐性—その仕組みと調べ方—** (担当した章: トレハロース輸送活性) 岡山大学出版会 9 ページ (147-155)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nias.affrc.go.jp/anhydrobiosis>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黄川田 隆洋 (KIKAWADA TAKAHIRO)
独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号: 60414900