

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24年 4月16日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580071

研究課題名（和文） ショウジョウバエを用いたネムリユスリカの乾燥耐性候補遺伝子の遺伝学的解析

研究課題名（英文） Functional analysis of genes from an anhydrobiotic chironomid, *Polypedilum vanderplanki*, using the transgenic fly system

研究代表者

金森 保志（KANAMORI YASUSHI）

京都工芸繊維大学・ショウジョウバエ遺伝資源センター・研究員

研究者番号：70535799

研究成果の概要（和文）：完全に乾燥した状態で乾季を越すネムリユスリカから単離された 4 つの LEA タンパク質遺伝子と多量に蓄積されるトレハロースの機能を調査するために、遺伝子組換えキイロショウジョウバエ成虫を用いた乾燥耐性試験を行なった。4 つの LEA タンパク質の一つ、*PvLea1* を発現させた組換え系統の雄は逆に乾燥感受性を示す等、乾燥耐性を示す組換え系統が得られなかったことから、LEA タンパク質は乾燥に対し間接的に作用することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To analysis the functions of trehalose and four LEA proteins in the dried state of an anhydrobiotic chironomid, *Polypedilum vanderplanki* larva, desiccation-related genes were introduced into *Drosophila melanogaster*. The adult flies expressing four LEA protein genes had no additional tolerance for desiccation; moreover, *PvLEA1*-expressed male fly presented the sensitivity for desiccation. This suggests that *PvLEA* proteins concern with desiccation tolerance of *P. vanderplanki* indirectly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総 計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子生物、分子進化

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：乾燥耐性、ネムリユスリカ、トレハロース、LEA タンパク質、キイロショウジョウバエ

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の幼虫は、身体から完全に水分を蒸発させて代謝を止めるアンヒドロビオシスという状態で乾季を過ごす。この驚異的な乾燥耐性能力の鍵は、乾重量で約 20%も蓄積されるトレハロースと多量に発現する 4 種類の LEA タンパク質（*PvLEA1*～*PvLEA4*）と考えられ

ている。トレハロースは非還元性の二糖で、高濃度に存在してもグルコース等の還元性の糖よりも細胞毒性が低く、また、実際の生体保護効果を示すガラス転移点が他の糖よりも高いために安定的な保護効果が予想される物質である。LEA タンパク質は植物の種子に大量に存在するタンパク質として単離され、当初から種子の乾燥耐性への関与が示

唆されていたタンパク質で、そのアミノ酸配列上の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸のパターンから両親媒性 α ヘリックス構造をとり、イオンスカベンジャーやタンパク質凝集抑制など分子シャペロンとしての機能、そして細胞骨格様構造をとることによる物理的強化などにより生体を保護していると考えられている。しかしながらこれらの物質の作用機構については解明には至っていない。

2. 研究の目的

本課題の目的は、ネムリユスリカの乾燥耐性機構における4つのLEAタンパク質とトレハロースの関与を明らかにし、その機構の解明から乾燥耐性モデルを構築することである。乾燥耐性への関与を調査するには当該遺伝子の強制発現やRNAi等の遺伝子導入・組換え技術を用いた手法が有効であるが、ネムリユスリカではこれらの技術が確立されていない。そこでゲノム情報が明らかで、遺伝子導入技術が確立されており、さらに個別に導入した遺伝子の種類や数を染色体の組換え等の遺伝学的手法で増やすことが出来るキイロショウジョウバエを用いた実験から、4つのLEAタンパク質とトレハロースと乾燥耐性能力との関係を調査する。本課題で遂行するトレハロース及びLEAタンパク質と乾燥耐性との関与の個体レベルでの検証は、アンヒドロビオシスという乾燥に対する生物の究極の対応法を解明するための最初の一步といえる。また、他の生物に乾燥耐性を付与するという生物機能の利用・開発につながるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え体におけるネムリユスリカ由来遺伝子の発現の確認と通常飼育での影響について - 導入遺伝子の発現とその発現による通常飼育条件における生体への影響を調べるため、UAS(upstream activating sequence)に支配される*PvLea1-4*及びトレハロース輸送タンパク質(*PvTret1*)配列の遺伝子組換え系統と、全身で恒常的に発現誘導するAct5Cプロモーター配列に制御されるGal4配列が導入されている系統(Act5C-Gal4系統)と交配し、その子孫の第一世代(F_1)における羽化数と妊性の確認と、定量PCRによるmRNA発現の確認を行なった。

(2) 染色体組換えを利用した複数のネムリユスリカ由来遺伝子を持つキイロショウジョウバエ系統の作製 - ネムリユスリカ遺伝子導入系統間の交配を行ない、減数分裂時に起きる染色体の組換えを利用して、同一染色体上に2つ以上の導入遺伝子を持つ系統を導入遺伝子のマーカーである眼の色の強さを基準にスクリーニングし、さらにPCRにより

導入遺伝子を確認した。

(3) 食餌によるトレハロースの取込みの検出 - 乾燥ネムリユスリカ体内に蓄積されるトレハロースが全身に分布している状態を再現するには、トレハロースを生体内で合成させる方法と、外部から与える方法の2通りの方法が考えられる。内部で合成するにはトレハロースの基質となる多量のグルコースが必要となるため、グリコーゲンの摂取、トレハロースの合成の2段階の作業が必要である。一方、トレハロースそのものを通すことが判明しているPvTRET1を用いるとトレハロースを直接取り込ませることが可能と考えられ、作業手順を省くことが出来る。そこで本課題では外部からトレハロースを取り込ませる方法の検討を行なう。全身でPvTRET1発現を誘導し、20時間絶食させた成虫に1Mトレハロースを1時間食餌させ、顕微FT-IRを用いてトレハロースの取込みの検出を試みた。

(4) PvLEAタンパク質発現による乾燥耐性への影響について - キイロショウジョウバエの乾燥耐性に対する4つの*Pvlea*遺伝子の発現の効果を調査するため、導入した遺伝子について挿入位置が異なる2系統ずつ(第2染色体と第3染色体への挿入系統を用い、*PvLea3*については第3染色体の2系統)をAct5C-Gal4系統と交配して得た F_1 成虫個体を、シリカゲルを用いた乾燥(相対湿度(RH)10%以下)に置き、その生存率と、重量の変化から乾燥による水分量の変化を調査した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換え体におけるネムリユスリカ由来遺伝子の発現の確認と通常飼育での影響について - Act5c-Gal4系統と交配を行ない、 F_1 の成虫で導入遺伝子の発現を定量PCRによりmRNAの発現を検証したところ、調査した12系統(*PvLea1*・3系統、*PvLea2*・3系統、*PvLea4*・3系統、*PvTret1*・3系統)で導入遺伝子の発現が確認できた。導入遺伝子発現による生体への影響を調査するために、遺伝子発現の有無による性比や羽化数の違いを成虫で調査したところ、*PvLea1-4*導入系統では顕著な差は認められなかったが、*PvTret1*導入系統ではその発現が誘導された個体の数が減少する傾向が認められた。また、 F_1 個体間の交配を行なったところ、PvTRET1発現誘導個体は雄雌ともに不妊であった。そこで生殖腺を観察したところ、卵巣および精巣等の生殖腺は確認出来たものの、卵および精子等の生殖細胞は発育不全であった。これらからPvLEA1-4の恒常的発現は成長を阻害しないが、PvTRET1の発現は成長や生殖に影響

響を与えることが分かり、乾燥耐性能力の付与に当たって厳密な発現調節が必要であることが分かった。

(2) 染色体組換えを利用した複数のネムリユスリカ由来遺伝子を持つキイロショウジョウバエ系統の作製 - ネムリユスリカ由来遺伝子が様々な位置に挿入されている系統同士の交配の結果、第2および第3染色体上に2つの乾燥耐性関連遺伝子を持つ遺伝子組換え体を27系統作製し、さらに交配を行なうことで同一染色体上に3つの外来遺伝子を持つ系統を4系統作製した。これらの変異体シリーズの交配の組み合わせにより、ゲノム上に4つの *PvLea* タンパク質遺伝子と *PvTret1* を持つ系統を作製した。

(3) 食餌によるトレハロースの取込みの検出 - 通常状態でのトレハロース量を把握するため、幼虫と成虫の全身からの抽出液からトレハロースの検出を試みたところ、幼虫からは検出されたが成虫では検出限界以下であることが判明した。次いで *PvTRET1* 発現によるトレハロースの取り込みを確認するため、全身で *PvTRET1* 発現を誘導した成虫にトレハロースを食餌させたところ、消化管以外の組織での糖の存在は確認されたが、その量は微量でトレハロースであるかどうかは確定出来なかった。ネムリユスリカにおけるトレハロースの蓄積された状態をキイロショウジョウバエで再現するには、食餌時のトレハロースの濃度や取り込ませる時間を調節する他、トレハロース合成系酵素等によってショウジョウバエに合成させる方法等、検討の余地があるものと考えられる。

(4) *PvLea* タンパク質発現による乾燥耐性への影響について - *Actin5C-Gal4* 系統では *Actin5C* プロモーター-Gal4 配列が挿入されている染色体は翅が巻き上がる変異(Cy、巻翅)を持つバランス染色体とヘテロで維持されているので、 F_1 では遺伝子発現誘導個体(表現型は直翅、Gal4、+)と非誘導個体(巻翅、Gal4、-)が翅の表現型で判断出来る。そこで RH10%以下における直翅と巻翅の生存率を調べたところ、*PvLea2*、*3*、*4* および対照系統の w^{1118} では直翅の生存率が巻翅よりやや高い傾向が認められたが、*PvLea1*、特に乾燥開始24時間の雄では、第2染色体(2nd)および第3染色体(3rd)の両方の *PvLea1* 組換え体系統において、直翅の生存率が巻翅より低くなった(図)。この区分での生存個体が乾燥により失った水分を計量結果から算出したところ、直翅がやや多くの水分が失われている例があったものの有意な差は認められなかった。*LEA* タンパク質の機能として、両親媒性の性質による生体中の器官の保護やそれ自身の

親水性から、保湿効果等の乾燥に対する直接的な影響も予想されていたが、今回の結果から4つの *PvLea* タンパク質は単独では乾燥耐性に対し直接関与していないことが示唆された。

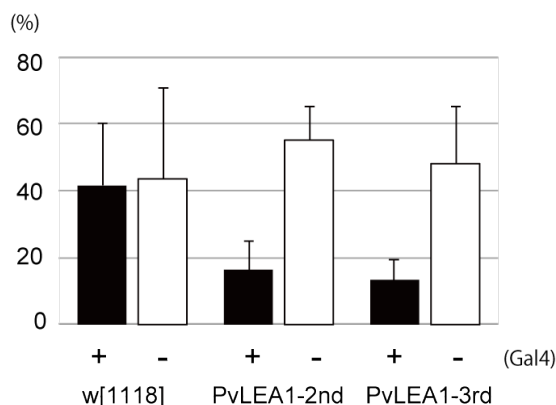


図) 乾燥24時間における成虫雄の生存率

(5) *PvLea1* の強制発現が乾燥感受性を引き起こすという結果は、これまで不明瞭であった *LEA* タンパク質の機能を探る上で逆説的にひとつの突破口ともいえ、キイロショウジョウバエにおける作用機構の調査からネムリユスリカにおける乾燥耐性機構の解明につながる知見が得られると期待される。また、*PvTret1* 導入系統では生殖細胞が未発達であったことは異所的に発現した *PvTRET1* が正常な糖の輸送(トレハロースとグルコース)を掻き乱したことの影響と考えられ、生命現象的にはショウジョウバエの生殖細胞の生育は特に糖の異常な移動の影響を受けやすいという新しい知見が得られた。本課題の実施期間内での乾燥耐性試験は4つの *LEA* タンパク質についてそれぞれ単独に導入された系統で行なったが、本課題で作製した *PvLea* タンパク質遺伝子を同時に発現することの出来る組換え体系統や、ネムリユスリカがアンヒドロビオシスを行なう時期である幼虫での乾燥耐性試験が今後の課題である。

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4件)

- ① 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, 査読有、Vol. 285、2010、pp. 35889-35899

- ② 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.、査読有、Vol. 277、2010、pp. 4215-4228
- ③ Shimizu, T., Kanamori, Y., Furuki, T., Kikawada, T., Okuda, T., Takahashi, T., Mihara, H., Sakurai, M.、Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides、Biochemistry、査読有、Vol. 40(6)、2010、pp. 1093-1104
- ④ Kanamori, Y., Saito, A., Hagiwara-Komoda, Y., Tanaka, D., Mitsumasu, K., Kikuta, S., Watanabe, M., Cornette, R., Kikawada, T., Okuda, T.、The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues、Insect Biochem Mol Biol、査読有、Vol. 40、2010、pp. 30-37

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① 金森保志、ショウジョウバエにおけるトレハローストランスポーター遺伝子の重複と進化、平成 24 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、平成 24 年 3 月 19 日、九州大学(福岡県)
- ② 金森保志、ネムリユスリカの乾燥耐性関連遺伝子を導入したキイロショウジョウバエにおける耐性能力検証の試み、第 12 回極限環境生物学会、平成 23 年 11 月 28 日、長崎大学(長崎県)
- ③ 金森保志、遺伝子組換えショウジョウバエによるネムリユスリカ乾燥耐性関連遺伝子の研究、日本遺伝学会第 83 回大会、平成 23 年 9 月 22 日、京都大学(京都府)
- ④ 金森保志、遺伝子組換えショウジョウバエによるネムリユスリカ乾燥耐性関連遺伝子の in vivo 解析、平成 23 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、平成 23 年 3 月 20 日、要旨掲載による発表
- ⑤ 金森保志、ネムリユスリカのゲノム構造

から見えてきた乾燥耐性獲得の進化過程、第 54 回日本応用動物昆虫学会小集会(招待講演)、平成 22 年 3 月 27 日、千葉大学(千葉県)

- ⑥ Kanamori Y.、Functional analysis of genes from an anhydrobiotic chironomid, *Polypedilum vanderplanki*, using the transgenic fly system.、International Bioresource Symposium “Drosophila”、平成 22 年 3 月 17 日、延暦寺会館(滋賀県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金森 保志 (KANAMORI YASUSHI)
京都工芸繊維大学・ショウジョウバエ遺伝資源センター・研究員
研究者番号：7 0 5 3 5 7 9 9

(2) 連携研究者

山本 雅敏 (YAMAMOTO MASATOSHI)
京都工芸繊維大学・ショウジョウバエ遺伝資源センター・教授
研究者番号：1 0 1 4 2 0 0 1

黄川田 隆洋 (KIKAWADA TAKAHIRO)
農業生物資源研究所
研究者番号：6 0 4 1 4 9 0 0

奥田 隆 (OKUDA TAKASHI)
農業生物資源研究所
研究者番号：6 0 4 7 9 8 4 3