

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14472

研究課題名（和文）ネムリユスリカの乾燥耐性メカニズムの全容解明に向けたゲノムワイド・スクリーニング

研究課題名（英文）Genome-wide screening for revealing molecular mechanisms of anhydrobiosis in *Polypedilum vanderplanki*

研究代表者

宮田 佑吾（Miyata, Yugo）

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・契約研究員

研究者番号：70623453

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：エネルギーフリー長期安定保存技術の開発に向けて、ネムリユスリカの乾燥耐性能は長らく注目を浴びてきた。しかしながら、その乾燥耐性メカニズムの分子基盤は全く不明であった。そこで、申請者は、ネムリユスリカ由来の細胞株であり、乾燥耐性能を持つ唯一の動物細胞株でもあるPv11細胞を用いて、検討を行った。まず、Pv11細胞においてCRISPR/Cas9システムを用いたゲノムワイドスクリーニング実験系の構築を行った。その過程でPv11細胞において、乾燥耐性能に必要な複数の遺伝子を同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネムリユスリカの乾燥耐性メカニズムを解明することで、既存の凍結保存技術に代わる、エネルギーフリーな長期常温保存技術の開発が期待されている。即ち、既存の凍結保存技術の問題点である「莫大なエネルギーコスト」や「停電のリスク」を回避しつつ、有用細胞やタンパク質などのバイオリソースを安定的に長期保存する新規技術の立脚が見込まれている。

また、Pv11細胞における分子生物学的実験系を構築する事で、Pv11細胞の産業応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Pv11 is a cultured cell line derived from embryos of the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki*. Like the midge, Pv11 cells also display extreme desiccation tolerance; consequently, the cells can be stored in a dry state at room temperature. To apply the amazing ability to store biological things under dry conditions at room temperature, many researchers have tried to reveal the molecular mechanisms of the desiccation tolerance. However, only a few mechanisms were cleared, and most of them were still unclear. So, I tried the genome-wide screening for understanding the molecular mechanisms of Pv11 cells. At first, I constituted the experimental system for the screening. Through the construction, I identified several genes necessary for the anhydrobiotic ability of Pv11 cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ネムリユスリカ 乾燥耐性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 水は生命にとって欠かせない物質である。生体内から水が失われると代謝活動は停止し、やがては死に至る。しかし、一部の生物は乾燥耐性能を持ち、乾燥して代謝が停止しても、再給水することで代謝活動を再開する。これは乾燥無代謝休眠と呼ばれる。ネムリユスリカはアフリカの半乾燥地帯に生息する昆虫であり、幼虫期にのみ乾燥無代謝休眠を発揮することで乾季を生きながらえることができる。この乾燥耐性メカニズムを解明することで、既存の凍結保存技術に代わる、エネルギーフリーな長期常温保存技術の開発が期待されている。

(2) これまでの研究から、ネムリユスリカは乾燥過程でトレハロースを大量に蓄積し、LEA タンパク質やチオレドキシニンなどを発現させることが分かっている。しかしながら、これらはネムリユスリカが乾燥過程で発現する遺伝子群のほんの一部に過ぎない。実際に、LEA タンパク質とトレハロースを哺乳類細胞に導入し、常温乾燥保存に取り組んだ研究はあるが、極めて短時間の保存にしか成功しなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 上記したように、ネムリユスリカの乾燥耐性メカニズムには、既知の因子以外にも乾燥耐性に中心的な役割を果たす因子の存在が想定される。そこで本研究課題では、ネムリユスリカを対象として乾燥耐性を司る新規因子の同定を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) まず、Pv11 細胞においてスクリーニングに必須の実験系を構築する。本研究課題では、CRISPR-screening を想定しているため、Pv11 細胞における CRISPR/Cas9 システムの構築を目指す。

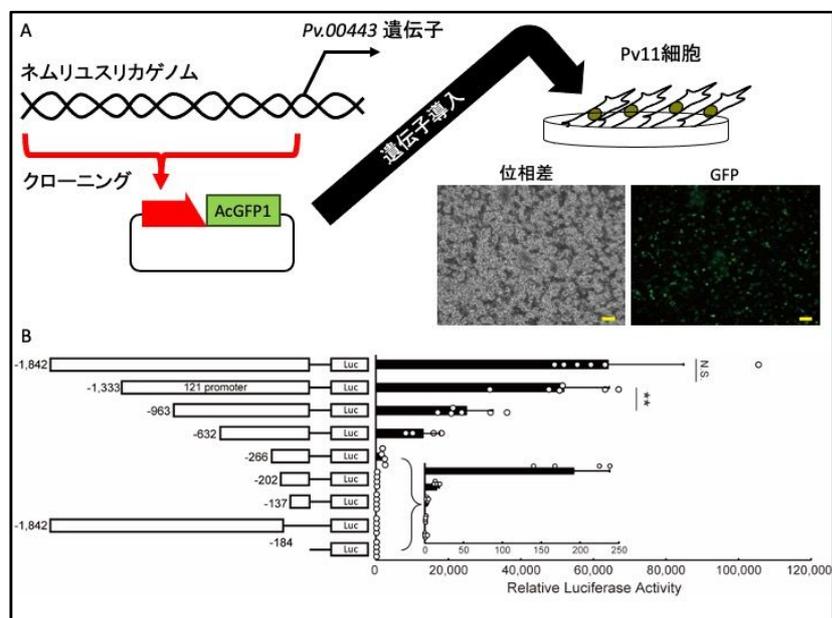
(2) 構築した実験系を用いて、genome-wide screening 実験系を構築する。

(3) Pv11 細胞において、乾燥耐性能に必須の遺伝子を同定し、ノックアウト細胞等を樹立して、各種解析を行う

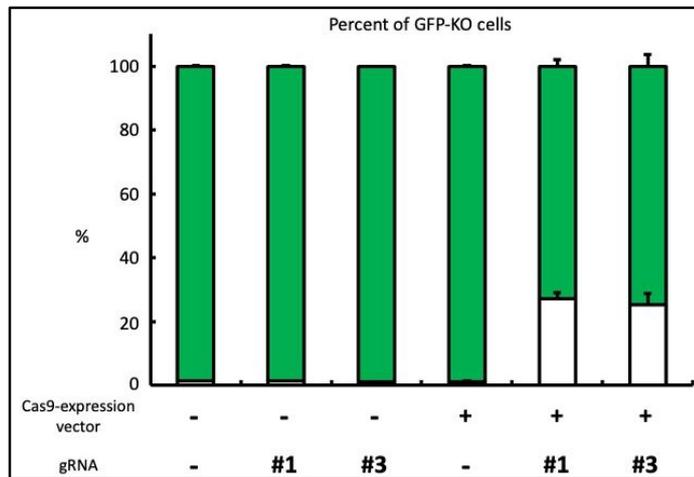
### 4. 研究成果

(1) 申請者はまず、分子生物学実験の基本でもある、過剰発現系の構築を目指した。Pv11 細胞では、既存の恒常活性プロモーター (OpIE2 プロモーターや CMV プロモーター等のウイルス由来のプロモーター) が全く機能しなかったため、申請者自身でプロモーターを構築する必要があった。そこで申請者は、ストレスの有無にかかわらず恒常的に高発現しているネムリユスリカの遺伝子のプロモーターに着目した。Pv.00443 と呼ばれる恒常高発現遺伝子上流領域に、期待するプロモーターが存在すると考え、約 1.8kb のゲノム領域を抽出した (下図 1A)。この配列の 3' 側に蛍光タンパク質 (AcGFP1) 遺伝子を配置したプラスミドを構築し、Pv11 細胞に遺伝子導入したところ、非常に強い蛍光が得られた。

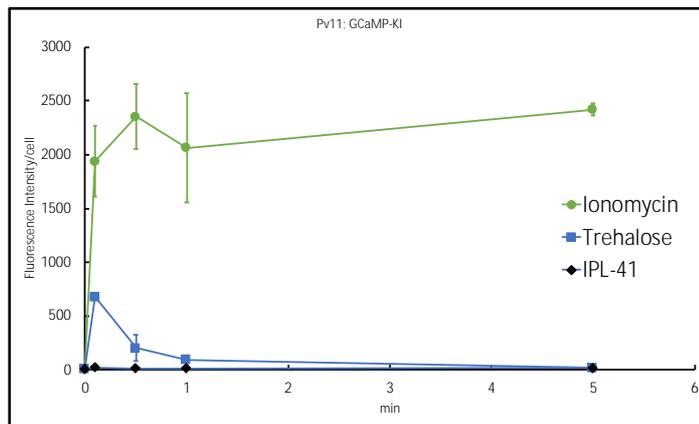
申請者はこのプロモーターを、Pv11 細胞における発現ベクターの基盤にしようと考えた。そこで、1.8 kb の配列と同等の転写活性を維持する最短領域の同定を目的として、デリションアッセイを行った (右図 1B)。その結果、1,333 bp の配列が決定された。この領域は、2014 年に報告済みのネムリユスリカドラフトゲノムの 121 番 scaffold に存在していたため、121 プロモーターと名付けた。



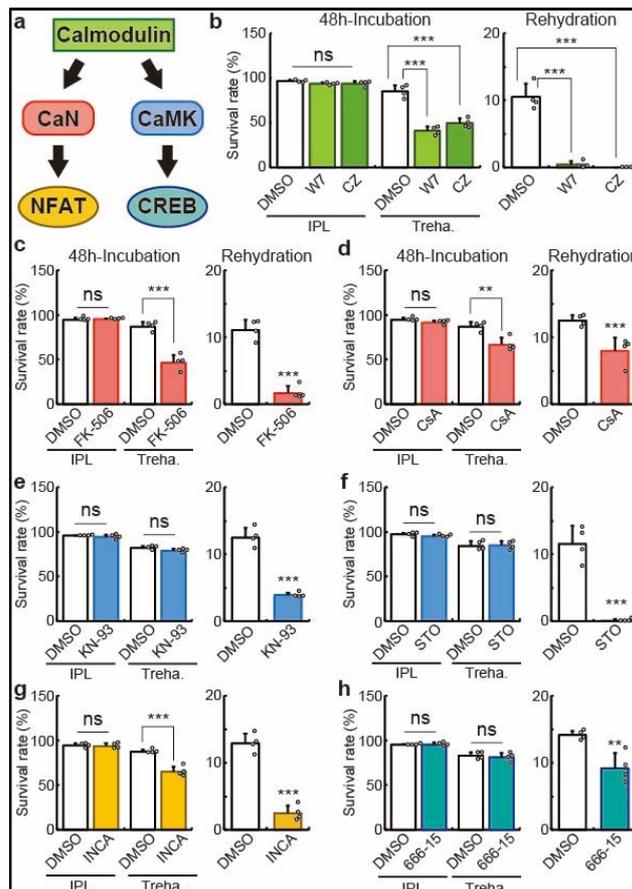
(2)次に、この過剰発現系を用いて、CRISPR/Cas9システムがPv11細胞で機能するかを検討した。AcGFP1恒常発現Pv11細胞に対して、Cas9発現ベクターと合成gRNAあるいはgRNA発現ベクターを同時に導入し、GFP蛍光が消失するかを検討した。その結果、GFP蛍光は消失し(右図)さらにそれらの細胞のゲノム配列を解析したところ、AcGFP1遺伝子上にin/del mutationが出現していた。以上のことから、Pv11細胞においてCRISPR/Cas9システムが機能する事がわかった。



(3)次に、このゲノム編集技術を用いて、乾燥耐性メカニズムを探るべく、細胞内カルシウムをセンシングするタンパク質、GCaMP3の恒常発現細胞株の構築を目指した。CRIS-PITCh法を用いて、Pv.00443のストップコドン直前に、ポリシトロニックにGCaMP3を発現できるように、ノックインを行った。その結果、乾燥耐性を失わずに、GCaMP3が恒常発現されたPv11細胞が構築できた。興味深い事に、この細胞をトレハロース処理したところ、直後にGCaMP3蛍光強度が増し、すぐに退色する現象が見られた。このことから、Pv11細胞の乾燥耐性メカニズムに、カルシウムシグナルの寄与が示唆された。



(4)次に、カルシウムシグナルがPv11細胞の乾燥耐性能に寄与しているかを検討した。代表的なカルシウムシグナル経路である「Calmodulin - Calcineurin - NFAT」および「Calmodulin - Calcineurin-dependent kinase - CREB」の阻害剤を用いて、乾燥再水和実験を行った。その結果、両方の経路が乾燥耐性能の誘導に必要であることが判明した。興味深いことに、「Calmodulin - Calcineurin - NFAT」の経路を阻害することで、トレハロース処理中の生存率が低下した。このことから、「Calmodulin - Calcineurin - NFAT」の経路は、乾燥耐性能の誘導のみならず、トレハロース処理中の生存にも寄与していることがわかった(右図)。



(5)上記の因子以外にも、Pv11細胞の乾燥耐性能に寄与する、新規トレハローストランスポーターも同定した。

(6)残念ながら、genome-wide screeningの実験系を完成させる事はできなかったが、この実験系を構築する過程で、様々な因子を同定できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 徳本 翔子、宮田 佑吾、黄川田 隆洋	4. 巻 54
2. 論文標題 乾眠できる昆虫ネムリユスリカの放射線耐性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 225-236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yugo Miyata, Shoko Tokumoto, Yoichiro Sogame, Ruslan Deviatiiarov, Jun Okada, Richard Cornette, Oleg Gusev, Elena Shagimardanova, Minoru Sakurai, Takahiro Kikawada	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of a novel strong promoter from the anhydrobiotic midge, <i>Polypedilum vanderplanki</i> , with conserved function in various insect cell lines.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43441-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Voronina Taisiya A., Nesmelov Alexander A., Kondratyeva Sabina A., Deviatiiarov Ruslan M., Miyata Yugo, Tokumoto Shoko, Cornette Richard, Gusev Oleg A., Kikawada Takahiro, Shagimardanova Elena I.	4. 巻 10
2. 論文標題 New group of transmembrane proteins associated with desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge <i>Polypedilum vanderplanki</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68330-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 布施 寛人、宮田 佑吾、徳本 翔子、コルネット リチャー、黄川田 隆洋	4. 巻 66
2. 論文標題 アガロース固着法を用いたSf9細胞による昆虫嗅覚受容体の機能解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 51～54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20585/cryobolcryotechnol.66.1_51	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tokumoto Shoko, Miyata Yugo, Usui Kengo, Deviatiiarov Ruslan, Ohkawa Takahiro, Kondratieva Sabina, Shagimardanova Elena, Gusev Oleg, Cornette Richard, Itoh Masayoshi, Hayashizaki Yoshihide, Kikawada Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a Tet-On Inducible Expression System for the Anhydrobiotic Cell Line, Pv11	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 781 ~ 781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects11110781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 水谷 晃輔、宮田 佑吾、徳本 翔子、黄川田 隆洋	4. 巻 66
2. 論文標題 ネムリユスリカの乾燥過程におけるトレハローストランスポーターの機能解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 121 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20585/cryobolcryotechnol.66.2_121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水谷 晃輔、菊田 真吾、コルネット リッシャー、宮田 佑吾、徳本 翔子、黄川田 隆洋
2. 発表標題 ネムリユスリカにおける新規トレハローストランスポーターの探索と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 布施 寛人、宮田 佑吾、コルネット リッシャー、黄川田 隆洋
2. 発表標題 GCaMPを用いた乾燥保存可能なカルシウムセンサー細胞の作成
3. 学会等名 低温生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 布施 寛人、宮田 佑吾、コルネット リシャー、黄川田 隆洋
2. 発表標題 Pv11細胞の乾燥耐性誘導時におけるカルシウム濃度変化の検出
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 徳本翔子、宮田佑吾、Ruslan Deviatiiarov、Richard Cornette、Oleg Gusev、黄川田隆洋
3. 学会等名 低温生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 徳本 翔子、宮田 佑吾、Richard Cornette、黄川田 隆洋
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田佑吾、徳本翔子、櫻井実、黄川田隆洋
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたネムリユスリカ培養細胞のゲノム編集とその応用
3. 学会等名 第63回低温生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田佑吾、徳本翔子、櫻井実、黄川田隆洋
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷 晃輔、宮田 佑吾、徳本 翔子、Richard Cornette、黄川田 隆洋
2. 発表標題 ネムリユスリカの乾燥過程におけるトレハローストランスポーターの機能解明
3. 学会等名 第65回低温生物工学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関