

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 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659048

研究課題名（和文） 動物の低温耐性誘導遺伝子の網羅的同定

研究課題名（英文） Systemic search for genes that confer tolerance to chronic cold exposure in *Drosophila*

研究代表者

梅田 真郷 (UMEDA MASATO)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10185069

研究成果の概要（和文）：

生物の進化の歴史が示すように、環境温は生物種の存亡を左右する最も強い淘汰圧の一つである。これまでに繰り返された地球の寒冷化と温暖化の中で、温度に対する抵抗性を獲得する戦略は生物種の存亡とともにその生息域にも大きな影響を及ぼして来ている。

本研究では、個体の低温耐性のメカニズムを解明する目的で、ショウジョウバエの恒常的な低温暴露に対する抵抗性を賦与する遺伝子の検索を行った。その結果、エネルギー代謝を抑制することにより、また食事におけるカロリーの制限により有意な低温耐性が誘導されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Earth has experienced cooling and warming cycles, and organisms exposed to these climate changes either were exterminated or adapted to survive. The genetic variants that confer heat- or cold-resistance to organisms must be selected during the period of extreme climate change, with these mutant populations then spreading over geographic regions that the ancestral population would never have been able to inhabit. The present divergence of wildlife may in part result from such adaptive changes in the genome.

Drosophila melanogaster, a useful model organism in genetics, has its origin in tropical Africa, and has established its status as a cosmopolitan by acquisition of cold resistance in evolution. In this study we searched for the genes that confer tolerance to chronic cold exposure, and found that the suppression of energy metabolism, especially of mitochondrial oxidative phosphorylation, conferred a significant increase in cold tolerance. Caloric restriction also significantly enhanced the cold tolerance. We discuss possible mechanisms underlying the effect of energy metabolism on cold tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：低温耐性、遺伝子、ショウジョウバエ、エネルギー代謝、ミトコンドリア、酸化リン酸化、カロリー制限

1. 研究開始当初の背景

低体温を可能にすることは、エネルギー代謝抑制、寿命の延長、人工冬眠、心・脳疾患治療、臓器移植等における革新的な医療技術開発への道を拓くことから、これまで数十年にわたって様々な角度から研究がなされて来た。しかし、低温耐性を誘導する有効な手法は未だ見出されていない。

一方、多くの変温動物や一部の哺乳類や鳥類では、餌不足や低温などの気候変動による環境条件の悪化を克服するために体温を下げ、生物活動を一時停止する。このような動物は異温動物と呼ばれ、数℃まで体温が低下しても生体機能は保全される。冬眠動物を含めたこれら異温動物を対象として、細胞や体液の構成成分、膜脂質流動性やイオンチャネル機能、エネルギー産生器官であるミトコンドリア等について数多くの研究がなされているが、低温耐性誘導に関わる有力なメカニズムは未だ見出されていない。また、様々な動物において低温環境下あるいは冬眠時に誘導される遺伝子・タンパク質等が数多く同定されている。しかし、個々の因子が低温耐性獲得において如何なる役割を果たしているのかを実験的に検証した例は僅かであり、当該分子の遺伝子改変個体を作製することにより低温耐性が再現された例は未だ無い。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの分子遺伝学的手法を駆使して、特定遺伝子の機能を抑制した遺伝子改変個体を作製・解析することにより、個体の低温耐性誘導に関わる遺伝子群を網羅的に同定することを第一の目的とする。さらに、当該遺伝子産物の機能解析から低温耐性誘導の分子機構を明らかにすることを最終目的とする。

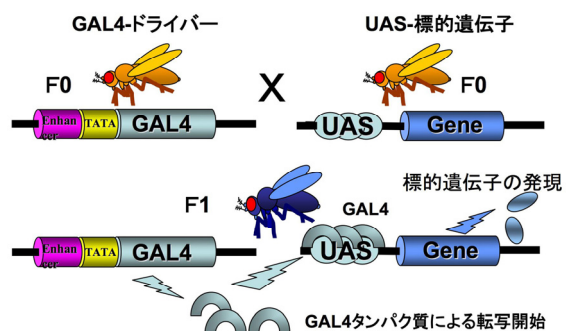
3. 研究の方法

(1) GAL4-UAS システムを用いた遺伝子の発現抑制

GAL4 エンハンサートラップ法は、1993 年にショウジョウバエにおいて開発された方法であり、ゲノム上に存在する組織特異的なエンハンサー活性を利用して、酵母転写因子 GAL4 を発現させる方法である。ゲノム上の様々な部位に GAL4 遺伝子を含むコンストラクトが組み込まれた GAL4 ドライバー系統群が多数作製され、各系統において GAL4 が発現する細胞群について詳細な解析がなされている。GAL4 エンハンサー-トラップ法と UAS

システムを組み合わせることにより、GAL4 ドライバー系統と GAL4 転写因子の認識配列である UAS(upstream activator sequence)の下流に任意の遺伝子を配置したコンストラクトを組み込んだ UAS-標的遺伝子系統を掛け合わせた F1 個体において、GAL4 の発現する特定の細胞で標的遺伝子を発現誘導することが可能となる（図 1）。本研究では、まず、国立遺伝学研究所で公開しているショウジョウバエ遺伝子の UAS-RNA 干渉配列を組み込んだ RNA 干渉系統群を用い、特定遺伝子の発現抑制により低温耐性誘導を指標に遺伝子の検索を行った。

<図 1. GAL4-UAS システムによる遺伝子の発現>



(2) 低温耐性試験

孵化後 4 日目の 3 齢前期の幼虫を洗浄し、新しい培地で 1 日飼育後、50 匹 1 群としてシャーレに移し、2℃24 時間飼育後、25℃に戻した後の蛹への分化を指標に生存率を求める。

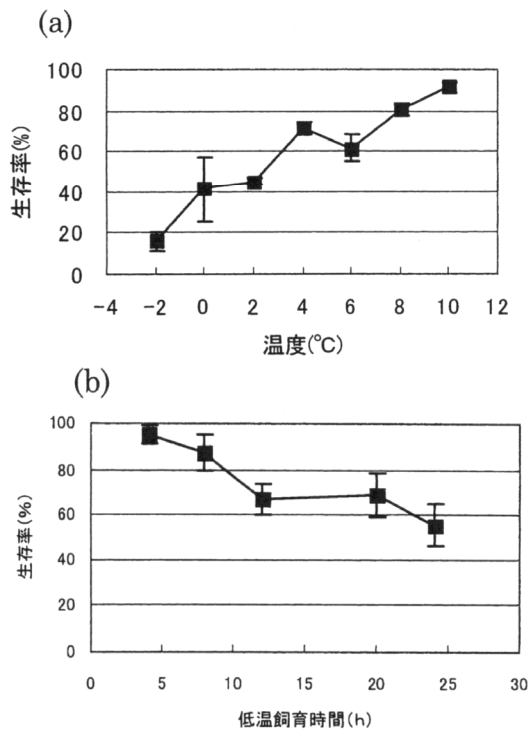
4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ幼虫を用いた低温耐性評価系の確立

これまでに行われて来た低温耐性に関する研究の多くは、主に成虫の低温耐性を観察するものが多いが、ショウジョウバエ幼虫が成虫よりも温度に対する感受性が高いことが報告されていることから、幼虫の用いた低温耐性の評価系の確立を行った。生死判定の基準としては、成虫へと生育できるか否かにより判定することが可能であるが、この方法では分化・発達への温度の影響を検討することにもなるため、低温暴露の際の幼虫の状態を観察することにより生死判定の基準を評価することにした。

低温条件については、ショウジョウバエの生息域を想定し、体液が凍結する様な氷点下での低温耐性ではなく、氷点以上での長時間暴露に対する耐性に着目して研究を進めた。一般に、ショウジョウバエ幼虫は 9~10°C で成長が止まり、-17~-20°C で体液が凍結することから、-2°C~10°C の温度域に数時間から 24 時間程度暴露した際の状態を観察した。孵化後 5 日目の 3 齢幼虫を 2°C で処理すると、ほぼ全ての幼虫は分化を停止しているが、詳細に観察すると体液の循環が観察できる個体と観察されない個体が混在していた。そこで、低温暴露の後、通常の飼育温度 25°C に戻した後の状態について時間を追って観察した結果、体液の循環している個体のほとんどは蛹に分化するが、循環していない個体はフェノールオキシダーゼの活性化により黒色に変色し、組織が崩壊し死に至っている。低温処理後の体液の循環を指標に生死を判定した場合と蛹への分化を指標にした場合での生存率の有意な相違は観察されないことから、蛹への分化を指標に生存率を求めることにした。温度および暴露時間の生存率への影響を検討した結果を図 2 に示す。

<図 2. 温度(a)および暴露時間(b)の生存率への影響>

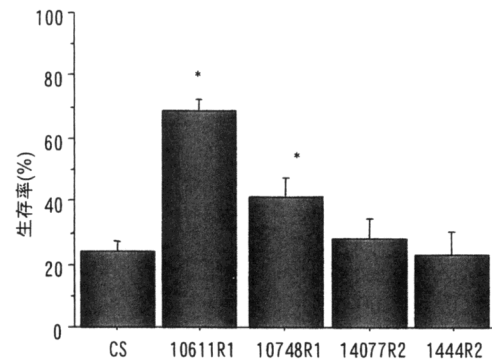


(2) 低温耐性誘導遺伝子の検索

上記の検討から、2°C で 24 時間暴露後の生存率の算出により、低温耐性のスクリーニングを行った。まず、国立遺伝学研究所で公開しているショウジョウバエ遺伝子の UAS-RNA 干渉配列を組み込んだ RNA 干渉系

統群のうち致死性を示さない約 200 系統について、アクチンドライバー系統との交配後の F1 個体について検討した。その結果、解糖系から酸化的リン酸化に至るエネルギー代謝制御に関わる一部の遺伝子の発現抑制により、顕著な低温耐性が誘導されることが明らかとなった。図 3 にその一例を示す。フルクトース 1,6-二リン酸ホスファターゼ、リンゴ酸脱水素酵素の発現抑制により有意な低温耐性の誘導が認められる。一方、チトクロム C オキシダーゼ、ステロイド脱水素酵素では有意な違いは認められていない。

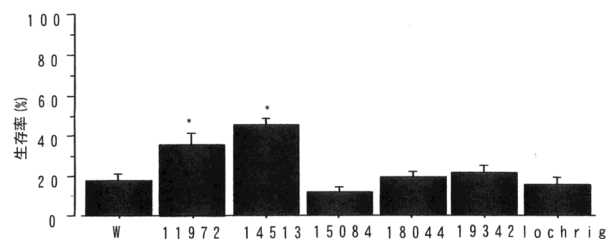
<図 3. RNA 干渉系統を用いた低温耐性遺伝子の検索>



stock#	CG#	gene
10611R1	CG10611	fructose-1,6-bisphosphatase
10748R1	CG10748	malate dehydrogenase
14077R2	CG14077	cytochrome c oxidase subunit VIa
1444R2	CG1444	steroid dehydrogenase

次に、エネルギー代謝制御において中心的な役割を担う遺伝子群について、P 因子挿入による突然変異体系統についても解析を行った。これらの株は、Bloomington Drosophila Stock Center から入手し、当研究室および国立遺伝研で保有する標準株と交配することにより遺伝的背景をそろえた後に解析を行った。その結果、ピルビン酸をアセチル CoA へと変換し、昆虫のエネルギー代謝調節で中心的な役割を担うピルビン酸脱水素酵素 (PDH) の抑制により最も顕著な低温耐性の誘導が観察された (図 4)。

<図 4. P 因子挿入変異体の低温耐性>



stock#	CG#	coding gene
11972	CG7010	pyruvate dehydrogenase(PDH)
14513	CG7010	pyruvate dehydrogenase(PDH)
15084	CG8808	pyruvate dehydrogenase kinase(PDK)
18044	CG12151	pyruvate dehydrogenase phosphatase(PDP)
19342	CG5889	malate dehydrogenase
12966	CG5216	sirtuin
14640	CG7951	sima
loe	CG17299	SNF4Agamma subunit

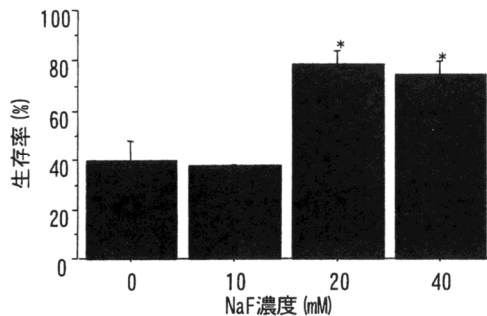
(3) 薬剤処理およびカロリー制限による低温耐性の誘導

上記の遺伝子群のスクリーニング結果は、エネルギー代謝経路の抑制により有意な低温耐性が誘導されることを示している。そこで、解糖系および電子伝達系を阻害する薬剤の投与による低温耐性の変化を検討した。

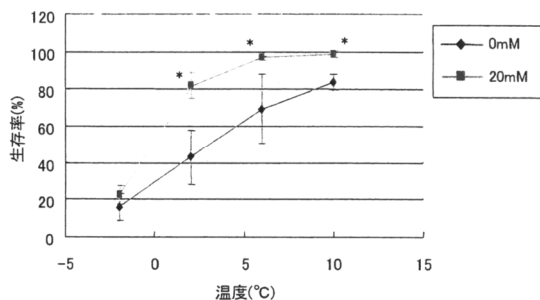
薬剤処理は、孵化後4日目の3齢幼虫を阻害剤を含む培地で一晚飼育した後に、アッセイプレートに移し、2℃で24時間処理後の生存率を観察した。まず、解糖系のエノラーゼを阻害するNaFについて検討したところ、有意な低温耐性の上昇が観察された。図5にNaFの濃度依存性および各低温条件での生存率に及ぼす影響を示す。

<図4. NaFによる低温耐性の誘導>

(a) NaFの濃度依存性

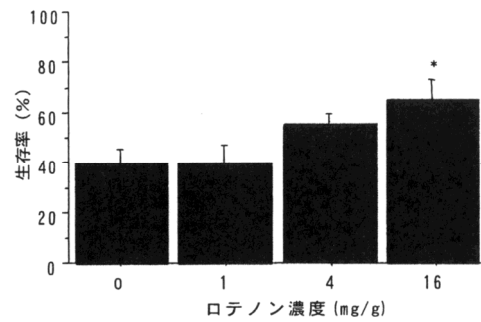


(b) 各温度条件での耐性の変化



電子伝達系阻害剤として、複合体 I を阻害するロテノン、複合体 IV を阻害するアジ化ナトリウム、ミトコンドリアのタンパク質合成を阻害するドキシサイクリンのいずれの投与によっても有意な低温耐性の上昇が観察された。図5にロテノンの結果を示す。

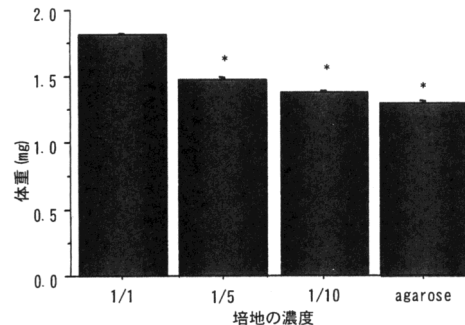
<図5. ロテノン投与による低温耐性の誘導>



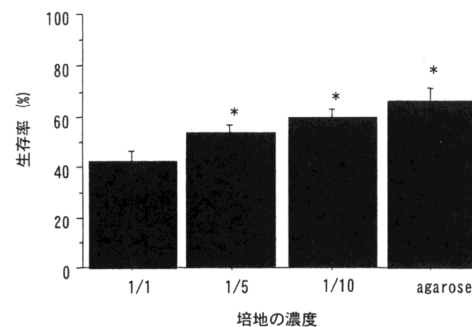
次に、食餌のカロリー制限を行うことによりエネルギー代謝を低下させた際の低温耐性に及ぼす影響を検討した。カロリー制限は、通常培地に含まれるグルコース、イースト、コーンミールの含量をそれぞれ、1/5 および 1/10 量およびいずれをも含まない培地で一晚飼育後に、2℃で24時間処理後の生存率を観察した。図6にカロリー制限を行った後の体重と生存率の変化を示したが、明らかに体重の減少に呼応して有意な低温耐性の誘導が観察された。

<図6. カロリー制限による低温耐性の誘導>

(a) カロリー制限後の体重の減少



(b) カロリー制限による低温耐性の上昇



一方、カロリー制限による寿命延長への関与が指摘されている sir2 遺伝子の P 因子挿

入変異体についても低温耐性への影響を観察したが、有意な変化は認められなかった。また sir2 の活性化剤であるレスベラトロールの投与にとっても有意な変化は観察されなかったことから、sir2 経路は関与していない可能性が高い。

以上、本研究によりエネルギー代謝を抑制することにより有意な低温耐性が誘導されることが明らかとなった。特に、ATP 産生の最終段階であるミトコンドリアの電子伝達系の障害により、顕著な低温耐性が誘導されることから、現在、ミトコンドリアの形態と機能の変化に着目して、より詳細な解析を加えている。

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 3 件)

1. Ikenouchi, J., Suzuki, M., Umeda, K., Ikeda, K., Taguchi, R., Kobayashi, T., Sato SB, Kobayashi, T, Stolz DB., Umeda, M.: Lipid polarity is maintained in absence of tight junctions. *J Biol Chem.* 287(12), 9525-33 (2012).
2. Ikenouchi, J., Umeda, M.: FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 748-753, (2010).
3. 山本真寿、加藤詩子、梅田真郷: リン脂質フリッパーゼによる「脂質場」の形成と細胞膜ダイナミクス、*実験医学* 28 (20)、3292-3299 (2010).

[学会発表] (計 5 件)

1. Masato Umeda : Membrane lipid control of behavioral thermoregulation and energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. Gordon Research Conferences in 2012, 2012.7.17-22, New Hampshire
2. 梅田真郷、加藤詩子: リン脂質フリッパーゼによる膜脂質ドメインの形成とその生物学的意義、第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、2011.3.29、横浜
3. Utako Kato, Masato Umeda : An approach for Lipid biology using *Drosophila melanogaster*, 第 33 回分子生物学会年会、2010.12.7、神戸
4. 梅田真郷: 膜リン脂質のダイナミズムとその生物機能、第 23 回植物脂質シンポ

ジウム、2010.11.26、京都

5. 梅田真郷: Molecular mechanisms linking energy homeostasis to behavioral thermoregulation in *Drosophila*, 第 87 回日本生理学会大会シンポジウム、2010.5.19、盛岡

[図書] (計 3 件)

1. 梅田真郷: 生体膜における脂質環境・ラフト、トランスポートソームの世界一膜輸送研究の源流から未来へ、京都廣川書店、359 (2011).
2. 梅田真郷: 生きた膜を支える脂質の分子運動、*生命誌年刊号「めぐる」*、新曜社、134-141 (2010).
3. 池ノ内順一、梅田真郷: 生体膜における脂質分子の局在および動態のイメージング、*化学フロンティア「生命現象を理解する分子ツール」*、化学同人、25-40 (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 真郷 (UMEDA MASATO)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 10185069

(2) 研究分担者

従二 直人 (JUNI NAOTO)
京都大学・大学院工学研究科・研究員
研究者番号: 90572199