

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82657

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510239

研究課題名(和文) 比較ゲノム解析による南極線虫の乾燥、凍結耐性遺伝子の探索

研究課題名(英文) Survey of anti-desiccation and ant-freezing genes in Antarctic nematodes by comparative genome analysis

研究代表者

鹿児島 浩 (Kagoshima, Hiroshi)

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構(新領域融合研究センター及びライフサイ・大学共同利用機関等の部局等・プロジェクト特任研究員)

研究者番号：00550063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：南極線虫 *Panagrolaimus davidi* は強力な乾燥・凍結耐性を持ち、体中の水分を失っても凍結しても死ぬことはない。この線虫の耐性遺伝子を明らかにするため、研究代表者は英国、ニュージーランドの研究者との共同で遺伝子の発現解析およびゲノム解析を行い、約2万6千種の遺伝子の中から耐性遺伝子の候補として LEA 遺伝子を見出した。この線虫は他の耐性生物と比べてもより多くの LEA 遺伝子(少なくとも14種類)を持っていることが分かった。研究代表者はこの遺伝子の研究をさらに押し進め、将来的には臓器や生体の保存に応用したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*, is a remarkable organism that tolerates desiccation and intracellular freezing. To elucidate responsible genes for the tolerances, I have performed large-scale transcriptome and genome analyses in collaboration with the researchers in UK and New Zealand, and identified 25,875 transcripts. We picked up a candidate gene family for the tolerances, LEA genes, which are reported only from organisms living in extreme environments. Although even these special organisms have one or a few LEA genes normally, *P. davidi* has excess number of (at least 14 types of) LEA genes. Promotion of this research may facilitate the application to preserve internal organs and living bodies in frozen and/or dry state.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：比較ゲノム 極限環境 乾燥耐性 凍結耐性 線形動物

## 1. 研究開始当初の背景

南極の生物は乾燥・凍結に対して強力な耐性を持つ。寒冷地に生息する生物はグリセロールなどの低分子化合物を生産することで凍結を回避することが知られているが、低分子化合物による凝固点降下の作用だけでは、極低温になる南極環境では生命は維持出来ない。また、乾燥耐性に関してはトレハロースの産生が重要な役割を果たすことは明らかであるが、トレハロースを増産することなく乾燥耐性を持つ生物や、逆にトレハロースを大量に持つにも関わらず乾燥耐性を持たない生物も多数あるため、この物質だけでは乾燥耐性は十分に説明できない。乾燥・凍結耐性を持つ生物は、これらの低分子化合物に加えて、耐性遺伝子の発現を行っていると考えられているが、その正体は未だ全く明らかになっていない。

研究代表者はこれらの耐性遺伝子の正体を明らかにし、その作用機序の解明を研究の目標として、強力な乾燥・凍結耐性を持つ南極線虫 *Panagrolaimus davidi* を材料に研究を開始した。この線虫は、これまでに知られている唯一の細胞内凍結に耐性を持つ生物であり、野生では一年のうち少なくとも8ヶ月以上を凍結、あるいは乾燥した休眠状態で過ごしている特殊な生物である。標準状態(適温である 20 °C において十分な水分、エサを与えた状態)と低温処理した *P. davidi* から cDNA ライブラリを作成し、遺伝子発現の比較を行う事で、環境に応じて発現量が大きく変動する遺伝子に注目することによって耐性を生み出す遺伝子の探索を行った。本解析結果から、研究代表者は LEA (Late Embryo Abundant) 乾燥耐性候補遺伝子を選択し、この遺伝子ファミリーを中心に研究を進めた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、南極線虫 *P. davidi* が持つ強力な乾燥、凍結耐性遺伝子の同定である。

申請者は、常温と低温環境、または湿潤と乾燥環境においた *P. davidi* で、発現量が大きく変化する遺伝子の中から耐性遺伝子の同定を行い、さらに耐性遺伝子の生体への遺伝子導入や精製タンパクを使った実験により、その作用機構を解明する。研究代表者は、本研究の成果は生理活性物質や臓器、生物個体の長期保存技術の開発にも応用できると考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 標準状態、および耐性環境処理した南極線虫 *P. davidi* の mRNA の発現プロファイル比較による乾燥、凍結耐性遺伝子候補の探索

環境ストレスのない良好な標準環境と、これを低温、乾燥処理した *P. davidi* から cDNA ライブラリを作成し、配列の解析を行う。これらの間の遺伝子発現パターンを比較し、環境条件で発現量が大きく変動する遺伝子を耐性遺伝子の候補として選び出す。

(2) 耐性遺伝子候補の産物の大量合成、精製、および生化学的解析

cDNA 配列解析の結果得られた凍結、乾燥耐性遺伝子候補のうち、特に乾燥耐性遺伝子 LEA (Late Embryo Abundant) を選択し、生化学的な活性を解析する。LEA タンパク質は大腸菌によって大量に合成し、その精製を行う。引き続き精製 LEA タンパクを用いて、凍結や乾燥からの膜やタンパク質の保護作用を解析する。

(3) *P. davidi* の耐性遺伝子候補の *C. elegans* への導入と、生体内での機能解析

耐性遺伝子候補である LEA 遺伝子は、*C. elegans* に遺伝子導入し、これらに耐性を付与することが出来るかどうかを検討する。

(4) *P. davidi* のトランスクリプトーム、およびゲノム解析

英国南極研究所の M. Thorne 博士、ニュージーランド、オタゴ大学の D. Wharton 博士らと共同して、RNA-Seq による転写物配列、およびゲノム配列解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### 1) 南極線虫 *P. davidi* の転写産物解析

研究代表者が解析した *P. davidi* の cDNA ライブラリの 6 万 3 千配列に加え、共同研究者である英国南極研究所の M. Thorne 博士、ニュージーランド、オタゴ大学の D. Wharton 博士らによる RNA-Seq による 29 Gb の転写物配列、および 37 Gb のゲノム配列を元にして、26,413 種類の遺伝子を同定した。これらの中に乾燥耐性の候補遺伝子である LEA、凍結耐性の候補遺伝子である AFP、またストレス耐性遺伝子であるトレハロース代謝酵素や、分子シャペロン、抗酸化酵素、さらに耐凍結に重要な遺伝子アクアポリンなどを見いだした。本研究の成果は国際誌 PLoS ONE に投稿した。本論文は修正が済み次第、掲載されることが決定している。現在、さらにこれらのデータを使って、この線虫の持つ特殊な能力、積極的な乾燥による凍結耐性についての論文を作成中である。これも今年度中に提出する。

##### 2) LEA 蛋白質の *in vitro/in vivo* 解析

上記の cDNA 配列解析により見いだされた乾燥耐性の候補遺伝子 LEA は 14 個の遺伝子からなる大きな遺伝子ファミリーを形成していた。これらの 14 種類の LEA ファミリーの全てについて大腸菌発現ベクターに組み替え、11 種類の LEA 蛋白質の大量発現に成功した。今後は精製 LEA を用いて酵素蛋白質や生体膜の保護活性の解析を進める。また、これら 14 種類の LEA 遺伝子配列をモデル線虫 *C. elegans* に導入し、外来遺伝子による耐性能付与の可能性について検討を行う。

##### 3) 南極線虫の長期冷凍保存

南極で 1983 年に採取され、その後、25 年間凍結保存された線虫 *Plecotus murrayi* の回復・増殖に成功した。この凍結保存期間は生物として世界最長の記録である。本研究結果は国際的な科学雑誌 *Cryo Letters* に掲載され、一般向けではあるが世界的に注目の高

い科学雑誌、ナショナルジオグラフィックの公式日本語サイトで紹介された。  
[http://www.nationalgeographic.co.jp/news/news\\_article.php?file\\_id=00020120910003&expand#title](http://www.nationalgeographic.co.jp/news/news_article.php?file_id=00020120910003&expand#title)

##### 4) 南極藓類に生息するクマムシの種同定、および飼育法の確立

南極で 2011 年に採取され、冷蔵保存された藓類サンプルからクマムシの単離、および実験室での飼育に成功した。これは形態的特徴、および 18S RNA 配列などから *Acutuncus antarcticus* と同定された。本研究結果は国際的な科学雑誌 *Journal of Limnology* に掲載された。この後、研究代表者らは南極湖沼からも *A. antarcticus* を採取することに成功し、この乾燥・凍結耐性が必要の無い環境からの「同一種」との比較を進め、二つの系統の間に耐性や遺伝的な差があるかどうかを解析している。現在、このクマムシについて南極由来の実験モデル生物とするためゲノム解析を進めている。

#### 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 9 件)

##### (1) Kagoshima H and Kohara Y.

Co-expression of the transcription factors CEH-14 and TTX-1 regulates AFD neuron-specific genes *gcy-8* and *gcy-18* in *C. elegans*. (2014) *Dev Biol*.

(Accepted with minor revision) 査読有

##### (2) Thorne M\*, Kagoshima H\*, Clark M, Marshall C and Wharton D. (\*authors equally contributed) Molecular analysis of the cold tolerant Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*. (2014) *PLoS ONE* (Accepted with minor revision) 査読有

##### (3) Kagoshima H, Cassata G, Tong YG, Pujol N, Niklaus G, Burglin TR. The LIM homeobox gene *ceh-14* regulates neurite

- outgrowth in select neurons. (2013) Dev Biol. 380:314-323 (DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.04.009) 査読有
- (4) Kagoshima H, Imura S, Suzuki AC. Antarctic tardigrade culture from moss samples near Syowa Station, East Antarctica. (2013) Journal of Limnology. 72(s1):15-23 (DOI: 10.4081/jlimnol.2013.s1.e3) 査読有
- (5) 鹿児島 浩 南極生物における凍結・乾燥耐性研究の現状 (2013) 極限生物学会誌 Vol.12 No2, p71-78 (<http://www.extremophiles.jp/gakkaishi.html>) 査読有
- (6) Kagoshima H†, Kito K, Aizu T, Shin-i T, Kanda H, Kobayashi S, Toyoda A, Fujiyama A, Kohara Y, Convey P, Niki H. († Author for correspondence) Multi-decadal survival of an Antarctic nematode, *Plectus murrayi*, in a -20 °C stored moss sample. Cryo Letters. 2012 Jul-Aug;33(4):280-288. ([http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol\\_33\\_4\\_2012.htm#280](http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_33_4_2012.htm#280)) 査読有
- (7) Nakai R, Abe T, Baba T, Imura S, Kagoshima H, Kanda H, Kohara Y, Koi A, Niki H, Yanagihara K, and Naganuma T. Diversity of RuBisCO gene responsible for CO<sub>2</sub> fixation in an Antarctic moss pillar. Polar Biology 2012 Nov; 35(11):1641-1650 (DOI 10.1007/s00300-012-1204-5) 査読有
- (8) Nakai R, Abe T, Baba T, Imura S, Kagoshima H, Kanda H, Kohara Y, Koi A, Niki H, Yanagihara K, and Naganuma T. Eukaryotic phylotypes in aquatic moss pillars inhabiting a freshwater lake in East Antarctica, based on 18S rRNA gene analysis. Polar Biology 2012 Oct; 35(10): 1495-1504 (DOI 10.1007/s00300-012-1188-1) 査読有
- (9) Nakai R, Abe T, Baba T, Imura S, Kagoshima H, Kanda H, Kanekiyo A, Kohara Y, Koi A, Nakamura K, Narita T, Niki H, Yanagihara K, and Naganuma T. Microflorae of aquatic moss pillars in a freshwater lake, East Antarctica, based on fatty acid and 16S rRNA gene analyses. Polar Biology 2012 Mar; 35(3): 425-433 (DOI 10.1007/s00300-011-1090-2) 査読有
- [学会発表](計12件)
- (1) 鹿児島 浩、小原 雄治、仁木 宏典. 南極線虫 *Panagrolaimus davidi* の乾燥耐性遺伝子の機能解析 2013年12月3日 日本分子生物学会第36回年会 ポートピアホテル
- (2) Hiraki H, Kagoshima H, Ueta Y, Kraus C, Schiffer P, Schierenberg E, Kohara Y. Genome and transcriptome analysis of the parthenogenetic nematode *Diploscapter coronatus*. 2013年12月3日 日本分子生物学会第36回年会 ポートピアホテル
- (3) Kagoshima H, Kohara Y, Niki H. Functional analysis of anti-desiccation gene in Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. The Fourth Symposium on Polar Science. 2013年11月12日 国立極地研究所
- (4) Kagoshima H, Kohara Y. The homeobox transcription factors, CEH-14 and TTX-1 regulate the AFD neuron specific gene expression of *gcy-8* and *gcy-18* in *C. elegans* 19th International C. elegans Meeting. June 26-30, 2013. UCLA, Los Angeles, USA
- (5) Kagoshima H, Kohara Y. LEA genes in Antarctic nematode, *Panagrolaimus*

- davidi*. 19th International *C. elegans* Meeting. June 26-30, 2013. UCLA, Los Angeles, USA
- (6) 鹿児島 浩、小原 雄治、仁木 宏典. 南極線虫 *Panagrolaimus davidi* の乾燥耐性タンパク質の機能解析 第14回極限環境生物学会シンポジウム 2013年6月15日 東洋大学白山キャンパス [招待講演]
- (7) Kagoshima H, Kohara Y. The homeobox transcription factors, CEH-14 and TTX-1, regulate AFD thermosensory neuron-specific expression of *gcy-8* and *gcy-18* in *C. elegans*. 日本分子生物学会第35回年会 2012年12月12日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- (8) Kagoshima H, Kunieda T Functional analysis of anti-desiccation proteins from Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*, and Japanese anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus* 第34回極域生物シンポジウム 2012年11月27日 国立極地研究所
- (9) Kagoshima H. Multi-decadal survival of an antarctic nematode, *Plectus murrayi*, in a -20 °C stored moss sample. 第33回極域生物シンポジウム 2011年11月18日 国立極地研究所
- (10) Kagoshima H and Kohara Y. The homeobox transcription factors, CEH-14 and TTX-1, regulate AFD thermosensory neuron-specific expression of *gcy-8* and *gcy-18* in *C. elegans*. 日本分子生物学会第34回年会 2011年12月15日 横浜パシフィコ
- (11) Kagoshima H and Kohara Y. Functional genomics of two Antarctic nematodes, *Panagrolaimus davidi* and *Plectus murrayi*. 18th International *C. elegans* Meeting. June 24, 2011. University of California, Los Angeles, USA
- (12) Kagoshima H and Kohara Y. The homeobox transcription factors, CEH-14 and TTX-1, regulate expression of *gcy-8* and *gcy-18* in *C. elegans*. 18th International *C. elegans* Meeting. June 24, 2011. University of California, Los Angeles, USA

〔その他〕

ホームページ等

線虫 *C. elegans* プロモーター配列データベース代表者

<http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/promoter/index.jsp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿児島 浩 (KAGOSHIMA Hiroshi)

研究者番号: 00550063

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

豊田 敦 (TOYODA Atsushi)

研究者番号: 10267495