

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780055

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特定と関連遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of the molecular mechanism of anhydrobiosis and functional gene analysis in the chironomid *Polypedilum vanderplanki*.

研究代表者

コルネット リシャー (Cornette, Richard)

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：20376586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：極限的な乾燥耐性能力を持つネムリユスリカ幼虫は乾燥しても死なない。再水和後に蘇生し、普通に発生し続ける。その乾燥耐性の分子機構を解明するために、蘇生過程の遺伝子発現を調べた。蘇生直後は抗酸化因子などのストレス関連遺伝子がまだ確認できたが、徐々に代謝が再開し、24時間後にDNAなどの修復が見られた。DNAの修復が影響する細胞周期のシンクロが認められなかった。一方、酸化ストレスにより、乾燥ストレス関連の遺伝子発現を誘導できるので、活性酸素が乾燥耐性の重要な引き金であると考えられる。ネムリユスリカの培養細胞で行った酸化ストレス応答の転写因子Cnc-Cを標的としたRNAi実験の結果はその仮説を裏付ける。

研究成果の概要(英文)：Larvae of the sleeping chironomid (*Polypedilum vanderplanki*) can survive total desiccation in an ametabolic state known as anhydrobiosis. Gene expression during the recovery process was investigated by microarray. Whereas stress genes, such as antioxidants, were still expressed during the resumption of metabolism just after rehydration, 24 h later, we observed genes involved in the repair of biological molecules. DNA repair is tightly associated with cell cycle but synchronization of cell cycle was not detected during anhydrobiosis. On the other hand, oxidative stress induced anhydrobiosis-related gene expression. Consequently, reactive oxygen species could be the main trigger of anhydrobiosis. Thus, we characterized the transcription factor involved in oxidative stress sensing, Cnc-C, whose expression was up-regulated upon desiccation. RNAi experiments on *P. vanderplanki* cell cultures suggested that Cnc-C was involved in the induction of anhydrobiosis-related gene expression.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：ネムリユスリカ 乾燥耐性 酸化ストレス マイクロアレイ解析 RNAi 培養細胞 Cnc-C 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

ネムリユスリカの幼虫はカラカラに乾燥しても死なない。アンヒドロピオシスという無代謝状態で数十年間も乾燥に耐えることができ、再び水に戻すと乾燥幼虫が一時間以内に蘇生し、発育を再開する。今までの研究結果からアンヒドロピオシスに関連する重要な遺伝子が多く同定されたが、アンヒドロピオシスの誘導メカニズムはまだ明らかになっておらず、ネムリユスリカの *in vivo* 機能解析ツールはまだなかった。

2. 研究の目的

ネムリユスリカの極限乾燥耐性に関わる重要な遺伝子を確認したあと、関連する細胞周期を調べる。アンヒドロピオシスの誘導メカニズムに関しては酸化ストレスに注目し、酸化ストレスに応答する遺伝子発現を乾燥ストレス応答と比較する。遺伝子機能解析ツールを開発した後、それを利用したアンヒドロピオシスの誘導メカニズムを検証する。

3. 研究の方法

遺伝子発現解析のためには主にマイクロアレイ解析を行った。乾燥幼虫の蘇生過程で 0 時間 (乾燥幼虫)、再水和後 1 時間、再水和後 2 4 時間のサンプルをコントロールの活動幼虫と比較した。また、活性酸素を誘導するパラコート 0.5mM、5mM と 50mM の濃度で処理した幼虫とネムリユスリカ由来の培養細胞 Pv210 をマイクロアレイで解析し、の遺伝子発現を調べた。遺伝子発現パターンをリアルタイム PCR で確認した。

アンヒドロピオシスの過程で細胞周期をフローサイトメーターで調べた。更に、組織切片を作成し、免疫染色で細胞分裂をリン酸化ヒストン p38 で検出し、ゲノム内の BrdU 取り込みも調べた。

遺伝子機能解析ツールの開発に関しては、主に RNAi を目指し、ネムリユスリカ由来の培養細胞 Pv210 と Pv11 に標的遺伝子の特異的な siRNA をエレクトロポレーションにより導入した。幼虫の場合は siRNA とトランスフェクション試薬の混合液を体腔内に注入した。RNAi 効果による目的遺伝子発現の低下をリアルタイム PCR で確認した。

一方、ネムリユスリカ由来の GAPDH プロモーターを含んだベクターをネムリユスリカ幼虫に注入し、局所的なエレクトロポレーションで導入し、GFP の過剰発現を誘導した。

4. 研究成果

ネムリユスリカの乾燥幼虫の蘇生過程で遺伝子発現を調べた結果、再水和直後 (1 時間) に代謝再開を表す酵素活性が顕著に見られたのに対し、乾燥耐性に関連する酸化因子、LEA タンパク質や HSP などの遺伝子発現はまだ検出できた。一方再水和 2 4 時間後に基礎

代謝の回復 (消化酵素、ヘモグロビンなどの発現) が進み、DNA、細胞膜、筋肉やクチクラなどの修復機能が見られた。蘇生過程におけるポリアミンの重要性も明らかになった。DNA 修復に関わる細胞周期をフローサイトメーターで追って、乾燥 2 4 時間と蘇生 4 8 時間に細胞分裂が活発に動いていることが示唆された。しかし、細胞分裂の指標であるリン酸ヒストン p38 は乾燥過程と関係なく消化管で検出した。蘇生直後の脂肪体で強い p38 シグナルも出たが、BrdU の取り込みが見られなかったことから細胞分裂と関係なく DNA の保護に関わる特殊なヒストン p38 が存在していると示唆された。

乾燥耐性における酸化ストレスの重要性が以前の発現解析から明らかになったので、酸化ストレスに応答する遺伝子発現をマイクロアレイで調べた。その結果、抗酸化因子、LEA タンパク質、HSP、PIMT、プロテアソームなどの遺伝子発現が誘導され、その発現パターンはアンヒドロピオシスの際に見られる発現パターンと同じだった。したがって、酸化ストレスはアンヒドロピオシスの誘導のために重要な引き金であることが示唆された。その仮説を検証するために酸化ストレス応答メカニズムの中心に働く酸化ストレスセンサーの Keap-1 と転写因子の Cnc-C と Maf-S の遺伝子を特定した。それらの遺伝子の発現は幼虫の乾燥過程と蘇生過程においても誘導されていた。特に Cnc-C の発現パターンは総合抗酸化能力のパターンと一致していた。

遺伝子機能解析を行うために RNAi を開発した。幼虫に siRNA を注入して効果を得ることができたが、ネムリユスリカの培養細胞に siRNA をエレクトロポレーションで導入した方が効果よく、その方法で実験を進めた。Cnc-C を標的した 3 種類の独立な siRNA を利用した実験で 80% の発現抑制効果が得られた。その RNAi 効果が一周間も継続することも確認した。Cnc-C の下流遺伝子に対する RNAi の影響を確認したところ、Cnc-C が基礎代謝 (リパーゼやヘキサメリンなど) を抑制し、乾燥耐性関連遺伝子 (TRET1, TPS, LEA タンパク質など) の発現を誘導することが確認した。したがって、Cnc-C は乾燥耐性を発揮するために重要な引き金であると考えられる。

最後に、遺伝子 knock-in 技術を目指し、ネムリユスリカ由来のプロモーター-GAPDH を利用した発現ベクターを作成した。幼虫にそのベクターを注入し、エレクトロポレーションより導入したあと、GFP 蛍光が筋肉組織で確認され、成虫まで発生しても GFP 蛍光が残っていた。今後のネムリユスリカの遺伝子機能解析のために有効な技術になると期待している。

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)

Hatanaka R, Hagiwara-Komoda Y, Furuki T, Kanamori Y, Fujita M, Cornette R, Sakurai M, Okuda T, Kikawada T (2013) An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, *PvLEA4*, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 1055-1087

Gusev, O, Hatanaka, R, Cornette R, Kikawada T. (2013) Diversity of LEA-like proteins and its mRNA expression in the sleeping chironomids. *Cryobiology and Cryotechnology*, 59 (1), 47-50.

Mukae K, Cornette R, Gusev O, Hatanaka R, Okuda T, Kikawada T (2012) Elucidation of mechanisms underlying desiccation tolerance with exhaustive gene analysis. *低温生物工学会誌* 58(1):73-76

〔学会発表〕(計8件)

Cornette R, Gusev O, Hatanaka R, Okada J, Kikawada, T, Okuda, T (2014) Oxidative stress and anhydrobiosis in the desiccation-tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki*. New frontiers in anhydrobiosis (Program and abstracts) 48

Cornette R, Gusev O, 志村幸子, 黄川田隆洋, 奥田隆 (2013) ユスリカ科における小さいゲノムサイズと極限環境に対する適応能力. 第14回極限環境生物学会年会プログラム&要旨集 (12) 44

Cornette R, Gusev O, Suetsugu Y, Okuda T, Kawashima T, Sato N, Nishiyama T, Hasebe M, Kikawada T (2013) Understanding the evolution of anhydrobiosis in the sleeping Chironomid, *Polypedilum vanderplanki*, by comparative genomics. *5th International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants* 44

Cornette R, 岩田健一, 金森保志, Gusev O, 黄川田隆洋, 奥田隆 (2013) ネムリユスリカの乾燥耐性における酸化ストレスの影響. 第57回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨 116

コルネット・リチャー, グセフ・オレグ, 末

次克行, 川島武士, 佐藤矩行, 黄川田隆洋 (2012) ネムリユスリカの極限的な乾燥耐性: 酸化ストレスと共に進化した現象なのか? 新学術領域研究「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」平成24年度公開シンポジウム

Cornette R, Iwata K, Kanamori Y, Gusev O, Kikawada T, Okuda T (2012) Oxidative stress is a major factor for the induction of anhydrobiosis in the desiccation-tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki*. *XXIV International Congress of Entomology* 133

Cornette R, Kikawada, T, Okuda, T (2012) Molecular mechanisms of anhydrobiosis in larvae of the African midge *Polypedilum vanderplanki*. *6th International Workshop on Desiccation Sensitivity and Tolerance in Seeds and Vegetative Plant Tissues* 69

Cornette R, Gusev O, Nakahara Y, Shimura S, Kikawada T, Okuda T (2011) Adaptation to extreme environments and small genome size in Chironomids. *4th International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants* 31

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者: コルネット・リシャー
(農業生物資源研究所)

研究者番号: 20376586

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: