

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252060

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を利用した極限的乾燥耐性遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Functional identification of anhydrobiosis-related genes using genome editing technology

研究代表者

黄川田 隆洋 (Kikawada, Takahiro)

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 新産業開拓研究領域・上級研究員

研究者番号：60414900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゲノム編集によるPv11細胞の乾燥耐性能力の機能破綻を指標として、ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠に決定的な役割を果たしていると考えられる遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的とした。手始めに、ターゲットとなる遺伝子の情報を得るために、ネムリユスリカのゲノムを解析した。ネムリユスリカのゲノムには、約200万カ所の潜在的なCRISPR/Cas9のターゲットが存在する事がわかった。また、独自の遺伝子発現系を構築することで、Pv11細胞で駆動するCRISPRシステムを確立させた。このCRISPRシステムを利用した、乾燥耐性をもたらす責任遺伝子の大規模スクリーニングが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Our aim of this study is to reveal the gene network underlying the extreme desiccation tolerance in the desiccation tolerant cultured cells, Pv11, derived from the sleeping chironomid using the genome editing, such as CRISPR/Cas9. At first, we deciphered genome sequence of the sleeping chironomid to seek potential targets for CRISPR/Cas9, and consequently found about 2 million sites as the targets in the genome. Simultaneously, we developed a CRISPR/Cas9 applicable to Pv11 cells based on the originally isolated promoter from the cells. The optimized CRISPR/Cas9 allows us to conduct the genome-wide screening to identify the genes responsible to anhydrobiosis in Pv11 cells.

研究分野：昆虫分子生物学・生化学

キーワード：乾燥耐性 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

生物にとって、水は代謝を動かす溶媒として必須である。細胞から水分が失われていくと代謝は停止し、最終的には死に至る。しかし、一部の生物は、完全に乾燥して代謝が停止しても死に至ることなく、再給水すると代謝が復活する。この現象は乾燥無代謝休眠(Anhydrobiosis)と呼ばれ、昆虫ではアフリカ半乾燥地帯に生息するネムリユスリカの幼虫のみに認められる。いったん乾燥無代謝休眠状態になったネムリユスリカは、半永久的に代謝を停止させることが可能である。しかも、水和させるだけで、約1時間で乾燥無代謝休眠から覚醒し、発育を再開する(図1)。

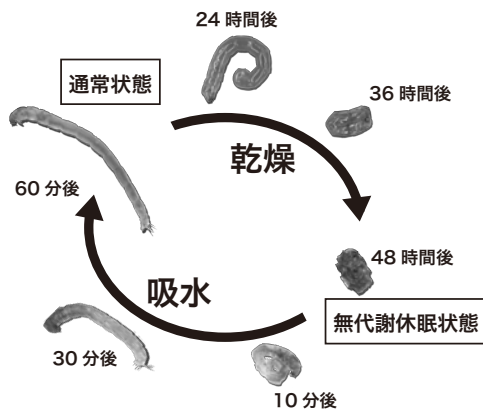


図1 ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠

これまで申請者の研究グループは、ネムリユスリカ幼虫が、乾燥刺激によって、タンパク質や細胞膜の構造を保護する活性を持つトレハロースを大量に合成し、乾燥した幼虫の体内隅々にトレハロースが分布することを明らかにした。また、ネムリユスリカ幼虫は、トレハロースと協調して細胞膜やタンパク質を保護する活性を持つ LEA タンパク質も乾燥に伴って蓄積する。同様な現象はほとんどの乾燥耐性生物共通に認められ、トレハロースと LEA タンパク質が乾燥時の細胞保護に寄与することは疑いない。しかし、ネムリユスリカ個体への遺伝子導入系が未完成のため、原因遺伝子を含めた乾燥無代謝休眠特異的な遺伝子ネットワークの全容は明らかにできていない。

ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠は、培養細胞でも再現できることが分かっている。Pv11 と命名した胚由来の培養細胞は常温乾燥耐性をもっていた(図2)。最近では、乾燥前の子備培養条件を検討した結果、3ヶ月以上の乾燥保存も可能となってきた。したがって、乾燥無代謝休眠という生命現象を研究するツールとして、Pv11細胞は利用可能といえる。培養細胞であれば、遺伝子の導入は容易に行える上、個体丸ごとを用いる実験と比較して組織特異的な遺伝子発現を考慮する必要が無いため解析結果をシンプルに評価でき、実験の再現性が保証されるメリットがある。

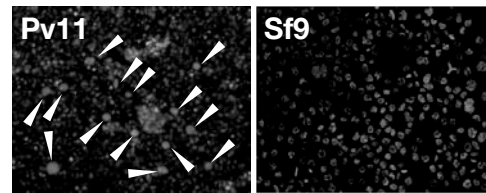


図2 乾燥耐性能力を發揮するネムリユスリカ細胞

乾燥24時間後に吸水させた細胞の状態を示す。Pv11, ネムリユスリカ胚由来細胞; Sf9, ヨトウガ由来細胞 生細胞 (矢尻)

2. 研究の目的

本研究は、人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子破壊による Pv11 細胞の乾燥耐性能力の機能破綻を指標として、ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠に決定的な役割を果たしていると考えられる原因遺伝子を含めた遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ネムリユスリカのゲノム情報を得た後、ゲノム編集のターゲットとなり得る配列を同定する。同時に、Pv11細胞用のゲノム編集技術として CRISPR/Cas9 が作動できる実験系を構築する。市販の昆虫細胞用遺伝子発現ベクター(pIZ; Invitrogen)で Cas9 の発現を試みる。作動が確認できなかった場合には、ゲノム情報に基づき恒常的且つ高発現している遺伝子の5'上流を単離し、そのプロモーター領域を得ることで、Pv11細胞で駆動する独自の遺伝子発現系を構築する。また、CRISPR/Cas9によるノックアウトの評価系として、GFP 恒常発現型の Pv11細胞の作出も行う。具体的には、上記の Pv11 用遺伝子発現ベクターに GFP 遺伝子を挿入したプラスミドを Pv11 に導入し、GFP を安定的に発現する細胞を得る。

以上の一連の実験系により、ネムリユスリカで作動しうる CRISPR/Cas9 システムを構築する。このシステムを使って、乾燥耐性に関連していると予測されている遺伝子を破壊することで、その遺伝子の乾燥耐性に対する貢献度を検討する。

4. 研究成果

本研究は、乾燥耐性の分子機構を解明するために、ネムリユスリカの培養細胞である Pv11 で作動可能なゲノム編集技術を開発することを第一目標とした。

手始めに、ターゲットとなる遺伝子の情報を得るために、ネムリユスリカのゲノムを解析した。ゲノム情報を解析した結果、ユニークな 21塩基且つ PAM 配列(NGG)をもつサイトが 1,929,750箇所存在していた(図3)。これらのサイトは、潜在的な CRISPR/Cas9 によるゲノム編集のターゲットとなる。

当初、Pv11細胞での Cas9 タンパク質の発現がほとんど認められなかった。これは市販されている昆虫用発現ベクターがチョウ目昆

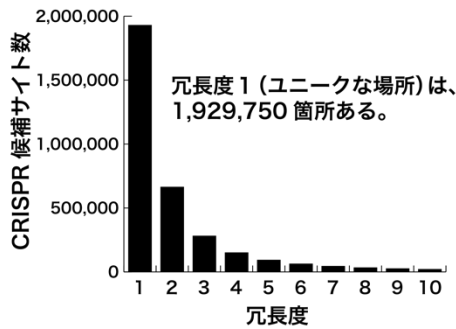


図3 CRISPR ターゲット:(N)₂₁GG に対して、Nが18塩基以上一致したものを同一ターゲットと見なして冗長度を算出した。

虫に感染するウイルスに由来するプロモーターを利用しているため、ハエ目昆虫であるネムリユスリカで十分に機能していないためであると考えた。そこで、Pv11細胞で機能しうる発現ベクターの構築から行うことにした。トランスクリプトーム解析から乾燥誘導性の遺伝子(PvGapdh)を同定し、そのプロモーターを組み込んだ発現ベクターを独自に構築した。pPGKと命名したこのベクターを用いる事で、Pv11細胞にGFPを安定的に発現させることが可能となった。この安定発現細胞をPv11-KHと命名した(図4)。このGFP発現をマーカー

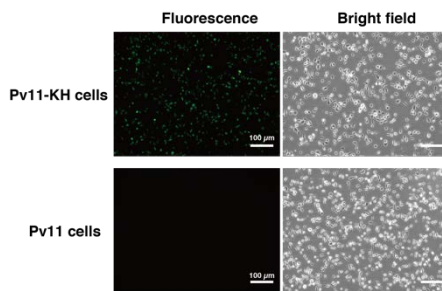


図4 Pv11-KH細胞は、恒常的にGFPを発現する。

一に、遺伝子ノックダウン及びノックアウトの実験系構築を進めた。GFP遺伝子に対するsiRNAをPv11-KH細胞に導入すると、極めて効率良くノックダウンができた。具体的には、タンパク質レベルで7.5%程度までGFPの発現量を低下させることに成功した。発現ベクターの構築は、Pv11細胞でのCas9タンパク質の発現も可能にした。Cas9を発現させたPv11-KH細胞に、GFP遺伝子をターゲットとしたガイドRNAを導入すると、GFPの発現を消失させることができた。蛍光を消失した細胞を集めてGFP遺伝子の配列を確認したところ、その遺伝子に欠失・挿入変異が生じていた(図5)。

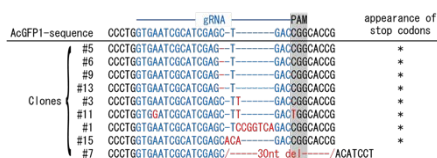


図5 CRISPR/Cas9システムにより、Pv11-KH細胞のGFP遺伝子に欠失・挿入変異が生じていた。

以上のことから、ネムリユスリカに特化したCRISPR/Casシステムが確立できたと結論づけた。目標の達成度は期待ほどでは無かったが、最適な遺伝子発現系すら不明だった非

モデル生物に対するゲノム編集技術を、基盤から完成まで順に構築していった点は評価に値すると考える。

今後は、本研究で構築したCRISPRによるゲノム編集技術を利用し、乾燥耐性をもたらす責任遺伝子の大規模スクリーニングを展開していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

- ① Sogame Y, Kikawada T. Current findings on the molecular mechanisms underlying anhydrobiosis in *Polypedilum vanderplanki*. (2017) *Current opinion in insect science* 19 16-21 (査読有)
- ② Deviatiiarov R, Kikawada T, Gusev O. The complete mitochondrial genome of an anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Chironomidae, Diptera). (2017) *Mitochondrial DNA* 28(2) 218-220 (査読有)
- ③ Sogame Y, Okada J, Kikuta S, Miyata Y, Cornette R, Gusev O, Kikawada T. Establishment of gene transfer and gene silencing methods in a desiccation-tolerant cell line, Pv11. (2017) *Extremophiles* 21(1) 65-72 (査読有)
- ④ Ryabova A, Mukae K, Cherkasov A, Cornette R, Shagimardanova E, Sakashita T, Okuda T, Kikawada T, Gusev O. Genetic background of enhanced radioresistance in an anhydrobiotic insect: transcriptional response to ionizing radiations and desiccation. (2017) *Extremophiles* 21(1) 109-120 (査読有)
- ⑤ 十亀陽一郎, 黄川田隆洋 (2016) ネムリユスリカの極限的な乾燥耐性のしくみ *化学と生物* 54(4):248-253 (査読無)
- ⑥ Hatanaka R, Gusev O, Cornette R, Shimura S, Kikuta S, Okada J, Okuda T, Kikawada T. Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki*. (2015) *Planta* 242(2) 451-459 (査読有)
- ⑦ Cornette R, Gusev O, Nakahara Y, Shimura S, Kikawada T, Okuda T. Chironomid midges (Diptera, chironomidae) show extremely small

- genome sizes. (2015) *Zoological science* 32(3) 248-254 (査読有)
- ⑧ Petrova NA, Cornette R, Shimura S, Gusev OA, Pemba D, Kikawada T, Zhironov SV, Okuda T. Karyotypical characteristics of two allopatric African populations of anhydrobiotic *Polypedilum* Kieffer, 1912 (Diptera, Chironomidae) originating from Nigeria and Malawi. (2015) *Comparative cytogenetics* 9(2) 173-188 (査読有)
- ⑨ Okada J, Kikuta S, Gusev O, Suetsugu Y, Cornette R, Sakuma T, Yamamoto T, Kikawada T. Construction of Optimized CRISPR/Cas System to Reveal the Mechanisms of Anhydrobiosis in the Sleeping Chironomid. (2015) *Cryobiology and Cryotechnology* 69(1) 69-73 (査読有)
- ⑩ 十亀陽一郎, 黄川田隆洋 (2015) ネムリユスリカのアンヒドロビオシス カラカラに干からびてもよみがえる驚異的な生命現象をかいまみる *化学と工業* 68(8):703-705 (査読無)
- ⑪ 黄川田隆洋 (2015) ネムリユスリカの乾燥耐性の秘密にせまる *現代化学* 529:48-52 (査読無)
- ⑫ Gusev O, Suetsugu Y, Cornette R, Kawashima T, Logacheva MD, Kondrashov AS, Penin AA, Hatanaka R, Kikuta S, Shimura S, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Shagimardanova E, Alexeev D, Govorun V, Wisecaver J, Mikheyev A, Koyanagi R, Fujie M, Nishiyama T, Shigenobu S, Shibata TF, Golygina V, Hasebe M, Okuda T, Satoh N, Kikawada T. Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge (2014) *Nature communications* 5 4784 (査読有)
- ⑬ 岡田淳, 黄川田隆洋 (2014) カラカラに干からびても死なない秘密：極限的な乾燥耐性はどのように進化してきたのか？ *細胞工学* 33(9):986-991 (査読無)
- ⑭ Hatanaka R, Hagiwara-Komoda Y, Furuki T, Kanamori Y, Fujita M, Cornette R, Sakurai M, Okuda T, Kikawada T. An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, PvLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. (2013) *Insect biochemistry and molecular biology* 43 1055-1067 (査読有)
- [学会発表] (計17件)
- ① 黄川田隆洋, 宮田佑吾, 十亀陽一郎, Richard Cornette, Oleg Gusev (2016) 極限乾燥耐性研究のモデル生物としてのネムリユスリカ. **第39回日本分子生物学会年会**. 2016.12.1 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) (招待講演)
- ② Kikawada T. (2016) Molecular mechanisms underlying anhydrobiosis, the ametabolic suspended animation, in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki*. **The joint meeting of the 22nd International congress of zoology & the 87th meeting of the Zoological society of Japan**. 2016.11.18 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県・国頭郡恩納村) (招待講演)
- ③ 黄川田隆洋 (2016) ネムリユスリカの耐性機構を応用した常温乾燥保存技術開発の可能性. **Cryopreservation conference 2016**. 2016.11.10 基礎生物学研究所 (愛知県・岡崎市) (招待講演)
- ④ Kikawada T, Richard Cornette, Oleg Gusev. (2016) Current knowledge of anhydrobiosis in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki*. **ICE 2016 XXV International congress of entomology**. 2016.9.27 Orlando (USA)
- ⑤ Kikawada T. (2016) Molecular mechanisms underlying the extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic insect *Polypedilum vanderplanki*. **Extremophiles 2016, 11th International Congress of Extremophiles** 2016.9.15 京都大学 (京都府・京都市) (招待講演)
- ⑥ 黄川田隆洋 (2016) なぜ乾いても死なない??ネムリユスリカの乾燥耐性機構の獲得と進化? **日本遺伝学会第88回大会** 2016.9.9 日本大学三島キャンパス (静岡県・三島市) (招待講演)
- ⑦ Kikawada T, Miyata Y, Sogame Y, Furusawa T, Kikuta S, Cornette R, Gusev O. (2016) The first edition of mutagenesis by CRISPR/Cas9 in the extreme desiccation tolerant cell. **The 10th International conference on bioinformatics of genome regulation and structure/system biology**.

- 2016.8.31 Novosibirsk (Russia) (招待講演)
- ⑧ 黄川田隆洋 (2016) 極限環境耐性機構のオミクス解析：どこまでネムリユスリカの秘密は解き明かされたのか. **第61回低温生物工学会セミナー及び年会** 2016.6.25 東京電機大学鳩山キャンパス (埼玉県・比企郡鳩山町) (招待講演)
- ⑨ 黄川田隆洋 (2015) ネムリユスリカのゲノム解析：極限乾燥耐性はどのように進化してきたのか **第17回日本進化学会大会**. 2015.8.22 中央大学後楽園キャンパス (東京都) (招待講演)
- ⑩ 黄川田隆洋 (2015) 干からびても蘇る！ネムリユスリカの極限乾燥耐性 **第18回自然科学研究機構シンポジウム** 2015.3.22 学術総合センター (一橋講堂) (東京都) (招待講演)
- ⑪ 黄川田隆洋 (2014) 比較ゲノムから見えてきたネムリユスリカの極限環境適応 **第12回農業バイオサイエンス研究会** 2014.12.5 神戸大学 (兵庫県・神戸市) (招待講演)
- ⑫ 黄川田隆洋, Gusev O, 末次克行, Cornette R, 川島武士, Logacheva M, Kondrashov A, Penin A, 畑中理恵, 菊田真吾, 志村幸子, 片寄裕一, 松本隆, Shagimardanova E, Alexeev D, Govorun V, Wisecaver J, Mikheyev A, 小柳亮, 藤江学, 西山智明, 重信秀治, 柴田朋子, Golygina V, 長谷部光泰, 奥田隆, 佐藤矩行 (2014) ネムリユスリカゲノムゲノム解析から見えてきた極限環境適応の進化 **第37回日本分子生物学会年会** 2014.11.26 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑬ Kikawada T. (2014) Comparative genome sequencing reveals genome signature of desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge. **International seminar "Life of Genome"** 2014.10.26 Kazan (Russia) (招待講演)
- ⑭ 黄川田隆洋, Gusev O, 末次克行, Cornette R, 畑中理恵, 菊田真吾, 志村幸子, 奥田隆 (2014) 比較ゲノム解析から見えてきた極限環境適応：ネムリユスリカの乾燥耐性 **第16回日本進化学会大会** 2014.8.24 高槻現代劇場 (大阪府・高槻市) (招待講演)
- ⑮ Gusev O, Suetsugu Y, Cornette R, Kawashima T, Logacheva M, Kondrashov A, Penin A, Hatanaka R, Kikuta S, Shimura S, Katayose Y, Matsumoto T, Shagimardanova E, Alexeev D, Govorun V, Wisecaver J, Mikheyev A, Koyanagi R, Nishiyama T, Shigenobu S, Shibata T.F, Galygina V, Hasebe M, Okuda T, Satoh N, Kikawada T (2014) Comparative genome sequencing reveals genomic signature of desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge **New Frontiers in Anhydrobiosis** 2014.3.24 ポミシエ (France) (招待講演)
- ⑯ 黄川田隆洋, Gusev O, 末次克行, Cornette R, 畑中理恵, 菊田真吾, 志村幸子, 奥田隆 (2013) カラカラに干からびても死なない生物のゲノム **第36回日本分子生物学会年会** 2013.12.5 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市) (招待講演)
- ⑰ Gusev O, Shagimardanova E, Rudakova N, Cornette R, Suetsugu Y, Kikawada T (2013) Some like it dry: hsp in the sleeping chironomid and their role in the complete desiccation resistance. FEBS congress 2013 2013.7.8 サンクトペテルブルク (Russia) (招待講演)
- [図書] (計1件)
- ① 黄川田隆洋 (2014) ネムリユスリカのふしぎな世界 (ウェッジ選書). ウェッジ. ISBN:4863101384.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
黄川田 隆洋 (KIKAWADA, Takahiro)
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 新産業開拓研究領域・上級研究員
研究者番号：60414900
- (2) 研究分担者
山本 卓 (YAMAMOTO, Takashi)
広島大学・理学研究科・教授
研究者番号：90244102
- (3) 連携研究者
コルネット リシャール (CORNETTE, Richard)
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 新産業開拓研究領域・主任研究員
研究者番号：20376586