

## 論文内容の要旨

### Study of molecular mechanisms regulating anhydrobiosis in a tardigrade, *Hypsibius dujardini*.

(ヤマクマムシの乾眠誘導機構の研究)

近藤 小雪

#### 【序論】

生物が新たな生息環境に進出するためには、進出先の環境に適した形質を身に付ける必要がある。例えば、海から陸上への進出に当たっては、それぞれの生物群が個別に乾燥防御機構を獲得したと考えられている

[1]。クマムシ類を始めとする一部の微小動物は体内

水分の喪失に耐える「乾眠」と呼ばれる特有の機構を獲得した。クマムシ類は基本的に水中に生息するが、土壌の間隙水やコケの上の水膜の中などに生息する陸生種の多くは、周囲の乾燥とともにほぼ完全に脱水し、無代謝状態となって乾燥に耐え、給水により生命活動を再開することができる(図1)。乾燥したクマムシの含水量は周辺環境の湿度によって異なり、高湿度環境(約湿度80%以上)ではある程度の水分を体内に保持できるが、低湿度環境(約湿度20%以下)では厳しい脱水が生じる。クマムシの乾眠様式は低湿度曝露への耐性の違いから2種類に分けることができる。一つは水中にいる状態から低湿度環境への直接的な曝露に耐えられるタイプであり、このタイプに属する種はコケのような頻繁に厳しい乾燥ストレスに曝される場所に生息している。もう一方は、直接的な低湿度曝露には耐性を持たないが、事前に弱い脱水条件(高湿度環境)に数時間から数日曝露する「プレコンディショニング」を行うことで低湿度曝露への耐性を獲得するタイプであり、池底や土壌など、乾燥ストレスに曝されることが稀な環境に生息する種に多く見られる。この様な種では、プレコンディショニング中に弱い乾燥ストレスを感知し、乾眠に必要な因子を誘導する機構が存在すると考えられるが、クマムシの乾眠誘導機構の分子基盤は全く分かっていなかった。



図1 乾眠能力をもつクマムシ (写真はヤマクマムシ)

本研究で私は、プレコンディショニングを必要とする種であるヤマクマムシ(*Hypsibius dujardini*)の乾眠誘導機構を解析し、この種は乾眠への移行に新規な遺伝子発現を必要とすること、また乾眠誘導を阻害する化合物を同定し、protein phosphatase (PP) 1/PP2A の活性が乾眠誘導に重要な役割を果すことを示唆した。さらに、RNA-seq を用いて乾眠誘導時に発現誘導される遺伝子群を同定し、その中から乾燥応答 (シス) エLEMENTの探索に有用な遺伝子を同定した。

## 【結果と考察】

### 1 ケミカルジェネティクスによる乾眠誘導に関わるシグナル伝達分子の探索

#### 1-1 乾眠誘導における新規な遺伝子発現の必要性

ヤマクマムシはプレコンディショニング中に乾眠に必要な因子を準備していると考えられる。この準備に新規な遺伝子発現が必要であるかを検証するために、クマムシを乾燥前に転写阻害剤 ( $\alpha$ -amanitin) 溶液に5時間浸漬し、その後、プレコンディショニングおよび低湿度曝露 (湿度 10%) を行った (図2)。その結果、阻害剤処理を行うとほぼ全ての個体が乾燥後に回復できなくなることが分かった (図3; 低湿度)。一方、低湿度曝露 (湿度 10%) の代わりに高湿度曝露 (湿度 95%) のみを行った対照実験では回復率は低下しなかったことから (図2、3; 高湿度)、低湿度曝露時の顕著な回復率の低下は非特異的な毒性によるものではなく、乾眠移行に必要な転写が阻害された結果と考えられる。翻訳阻害剤 (cycloheximide) を用いた実験でも同様の結果が得られたことから (図3)、ヤマクマムシの乾眠誘導には新規の遺伝子発現が必要であることが示唆された。

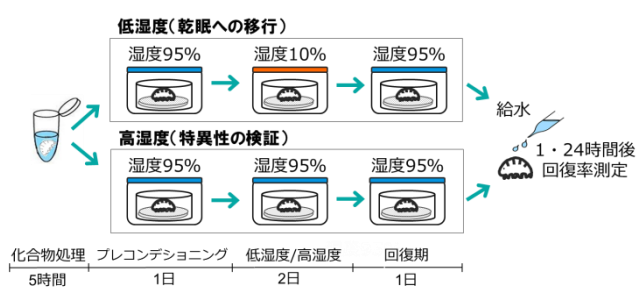


図2 化合物処理と乾燥実験のスキーム

クマムシを化合物溶液に浸漬した後、湿度を一定に保ったタイトボックスの中で一定時間乾燥処理を行った。乾眠への移行は低湿度曝露への耐性で検証し、高湿度環境のみに曝露した時の回復率によって化合物の非特異的な毒性を検証した。

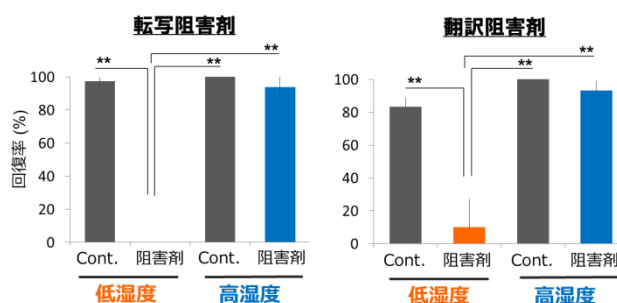


図3 転写/翻訳阻害剤による乾眠誘導特異的な阻害

グラフは給水から1時間後の回復率を示す。

N=3 or 4; 各 10 or 20 匹, \*\*  $P < 0.01$ ; Tukey-Kramer test

#### 1-2 乾眠誘導に関わるシグナル伝達分子の探索

ヤマクマムシの乾眠誘導には新規な遺伝子発現が必要であることから、外界の乾燥を感知して適切な遺伝子の発現を誘導するシグナル伝達経路の存在が推定された。そこで乾眠誘導に必須なシグナル経路の同定を目的として、既知の様々なシグナル伝達経路の阻害剤 81 種を選別し、図2と同様の実験系を用いてヤマクマムシの乾眠誘導を阻害する化合物の探索を行った。その結果、有意な阻害作用を示す5種の化合物を同定した。いずれの化合物も高湿度曝露のみを行った場合には回復率に影響を与えなかった

ことから、乾眠誘導を特異的に阻害したと考えられた (図4)。中でも最も安定して強い阻害作用を示した化合物は、PP1/PP2A の選択的阻害剤 cantharidic acid (CA) であった。別種の PP1/PP2A の選択的阻害剤である okadaic acid と tautomycetin も同様に乾眠誘導を特異的に阻害したことから、PP1/PP2A の活性がヤマクマムシの乾眠誘導に必要であることが示唆された。PP1/PP2A の乾眠への関与を示唆したのは本研究が初めてである。PP1/PP2A は、哺乳類や線虫では酸化ストレスからの防御に関わる転写因子 FOXO/DAF-16 の活性化に関与することが知られている。乾燥時に酸化ストレスも生じると考えられていることから、ヤマクマムシの乾眠誘導においても PP1/PP2A による FOXO の活性制御が関与している可能性がある。

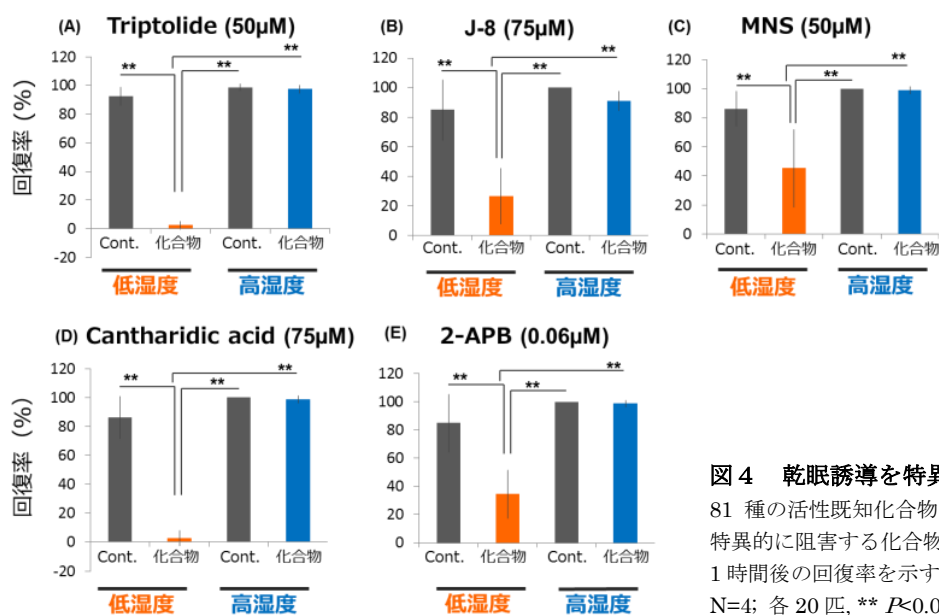


図4 乾眠誘導を特異的に阻害する化合物5種の同定  
81種の活性既知化合物のスクリーニングにより乾眠誘導を特異的に阻害する化合物を5種同定した。グラフは給水から1時間後の回復率を示す。  
N=4; 各20匹, \*\* P<0.01; Tukey-Kramer test

## 2 プレコンディショニング中の転写応答の解析

### 2-1 発現誘導遺伝子とそれに含まれる一次応答遺伝子の同定

ヤマクマムシの乾眠誘導には新規な遺伝子発現が必要であったことから、プレコンディショニング中に発現上昇する遺伝子は乾眠誘導に必要な遺伝子の良い候補となる。そこで、まずプレコンディショニング中に発現上昇する遺伝子を探索した。乾燥前のクマムシとプレコンディショニングを6時間行ったクマムシそれぞれの遺伝子発現を RNA-seq で解析・比較した結果、発現量が4倍以上上昇した発現誘導遺伝子を146個見出した。次にこれらの発現誘導遺伝子を区分けすることを試みた。今回同定された発現誘導遺伝子には、乾燥ストレスにตอบสนองして最初に転写される遺伝子 (一次応答遺伝子) と、一次応答遺伝子に含まれる転写因子などが機能し始めることによって転写される下流遺伝子 (二次応答遺伝子) が含まれると考えられる (図5)。

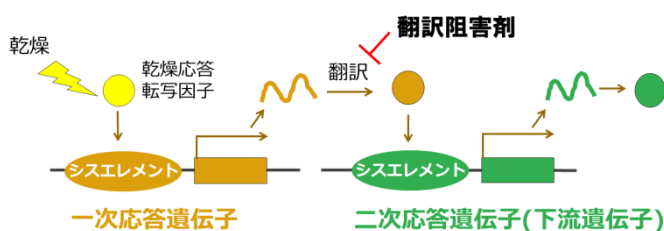


図5 翻訳阻害剤による一次応答遺伝子の選別  
乾燥ストレスにตอบสนองするシグナル伝達系により、最初に転写される遺伝子群を「一次応答遺伝子」、その中に含まれる転写因子などが翻訳されることで初めて転写される遺伝子を「二次応答遺伝子」とした。翻訳阻害剤処理は二次応答遺伝子の転写を抑制すると考えられる。

翻訳阻害剤によって新規の翻訳を抑制することで二次応答遺伝子以降の転写応答を阻害し、一次応答遺伝子の転写誘導のみを検出できると考えられたことから、翻訳阻害剤処理を行ってからプレコンディショニングしたクマムシの遺伝子発現を同様に解析し、乾燥前と比較した。その結果、146個の発現誘導遺伝子の内、翻訳阻害剤処理を行っても発現誘導される一次応答遺伝子候補を102個同定した。この中から、マップされたリード数が多く発現上昇が大きかった遺伝子を5個選別し、定量的RT-PCRにより発現パターンを確認した結果、少なくとも4種の遺伝子が翻訳阻害の有無に関わらず顕著に発現上昇することが確認された。これらの遺伝子は、乾燥ストレスに応答して最初に転写される一次応答遺伝子と考えられ、乾燥応答性のシスエレメントにより発現誘導を制御されている可能性がある。

## 2-2 一次応答遺伝子の転写制御におけるPP1/PP2Aの関与

化合物スクリーニングによって同定されたCAは乾眠誘導を特異的かつ強力に阻害したことから、この化合物は乾眠誘導の初期段階に作用している可能性を考えた。この可能性を検証するために、CAに浸漬した後にプレコンディショニングを行ったクマムシの一次応答遺伝子の発現変動を解析した結果、4種の一次応答遺伝子遺伝子の内、少なくとも2種の遺伝子はCA処理によりプレコンディショニング中の発現上昇が抑制された。一次応答遺伝子は乾燥ストレスを受けてから最初に転写される遺伝子であると考えられることから、CAの標的であるPP1/PP2Aは乾燥ストレスの感知とそれに応答した最初の遺伝子発現制御の間を繋ぐシグナル伝達経路に関わっている可能性が考えられる。

### 【まとめと展望】

本研究では、ヤマクマムシの乾眠を阻害する5種の化合物を同定し、乾眠誘導に関わるシグナル経路を初めて明らかにした。これらの化合物は乾眠誘導機構の解析の強力なツールになると考えられる。特に阻害剤の影響の大きさからPP1/PP2Aがヤマクマムシの乾眠誘導に重要な役割を担うことが示唆され、その基質の同定が乾眠誘導機構の解明において今後の重要な課題である。PP1/PP2Aは含まれる調節サブユニットの種類によって基質特異性が決定されることから、乾眠誘導に関わる調節サブユニットの特定が基質同定への第一歩になると期待される。また、プレコンディショニング中の発現誘導遺伝子とそれに含まれる一次応答遺伝子を同定した。これらの一次応答遺伝子はCAによって発現誘導が抑制されたことから、PP1/PP2Aが関与するシグナル伝達経路に発現誘導を制御されていると考えられる。今後は、同定した一次応答遺伝子の発現制御領域を解析することで、乾燥応答エレメントの同定や当該エレメントに結合するトランス因子の解明に繋がることが期待される。乾眠移行に必須な遺伝子制御機構とともにPP1/PP2Aの上流・下流の相互作用分子を同定し、それらの関係を明らかにすることによって、ヤマクマムシの乾眠誘導機構を分子ネットワークとして解明することにつながると期待される。

ヤマクマムシとヨコヅナクマムシに見られる乾眠誘導様式（プレコンディショニングの必要性）の違いは生息環境の乾燥頻度と良い相関を示し、両種の乾眠誘導様式の違いが各クマムシの生息環境を決定している可能性が考えられる。ヤマクマムシの乾眠誘導機構を明らかにし、ヨコヅナクマムシと比較することで、生物が新たな生息域に進出するための分子機構の進化の理解に繋がることが期待している。

### 参考文献

[1] Rota-Stabelli O, et al. *Curr Biol*. 2013; 23: 392-398