

## 極限環境耐性動物のゲノム基盤の解析

● 國枝 武和<sup>1)</sup> ◆ 片山 俊明<sup>2)</sup> ◇ 豊田 敦<sup>3)</sup>

1) 東京大学大学院理学系研究科 2) 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 3) 国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター

### <研究の目的と進め方>

水は生命にとって必要不可欠な存在であるが、ある種の動物はいったん水を失っても、給水とともに生命活動を再開する能力を持つ。こうした動物のうちとりわけ高い耐性を持つのが緩歩動物門を形成するクマムシ類である。クマムシは約 0.1-1mm の微小動物で、進化的には線虫などの線形動物門と昆虫などの節足動物門の間に位置すると考えられている。陸生クマムシの多くは乾燥耐性を持ち、周囲が乾燥すると脱水して乾眠と呼ばれる無代謝状態に移行する。乾眠状態では水分含量が数%にまで低下しており、一切の生命活動を示さない。この状態のクマムシは、驚異的な極限環境 (-273~151 度、真空 ~75,000 気圧、ヒトの致死量の 1000 倍の放射線) に対する耐性を示し、これらのストレス曝露後も給水により速やかに生命活動を再開する。

クマムシの持つ乾燥耐性・極限環境耐性の分子機構の解明は、細胞や臓器の乾燥保存など医療・産業的な応用面への展開が期待されると同時に、生命活動という動的なシステムが静的安定状態と可逆的にスイッチする仕組みは、システム生物学的にみても興味深い現象である。このため、ゲノム情報を基盤とした網羅的な遺伝子解析が必要とされている。これまで試料の確保が課題であったが、このたび、乾燥耐性をもつクマムシの効率的な培養系を確立し純系統のヨコヅナクマムシについて十分量の個体数が確保できるようになった。本研究では、支援班の協力を得てゲノム配列の解読を行うとともに、クマムシの活動状態・乾眠状態・復帰状態の EST 発現データを比較することによって、乾燥耐性のゲノム基盤と必要な遺伝子セットを網羅的に明らかにする。また、米国で開始される乾燥耐性をもたないクマムシのゲノムプロジェクトの成果を利用して比較ゲノム解析を行うことにより、進化的に乾燥耐性がどのように獲得されたのかを明らかにしたい。本研究成果のゲノム配列とアノテーションは全てデータベース化し広く公開する。

### <2008 年度の研究の当初計画>

これまでに 1 つの卵に由来する純系統のヨコヅナクマムシを確立し、YOKOZUNA-1 系統と名付けた。本年度は、この系統を材料として用い、以下のようにゲノム解読とトランスクリプトーム解析を開始する。

#### ・ゲノム解析

極限環境耐性のゲノム基盤を探るためにヨコヅナクマムシのゲノム概要配列を決定する。本年度は、Fosmid ライブラリの構築と、およそ 10x のホールゲノムショットガン解析を行う。ゲノムサイズはおよそ 70Mb であり、ゲノム解析に必要な量の DNA を調製するためヨコヅナクマムシの成体を約 1 万匹準備する。予備実験の結果からクマムシ 1 万匹から得られるゲノム DNA は約 4

μg と算定される。Fosmid ライブラリ構築およびショットガン解析は支援班の協力を得て行いたい。

#### ・乾眠時に変動する遺伝子群の同定 (完全長 cDNA 解析)

乾眠に移行するためには時間をかけて乾燥する必要がある、この間に乾燥耐性の準備をしていると考えられている。このため、乾眠前後での変化を解析することで乾燥耐性機構の一端を明らかにできる。乾眠時に変動する遺伝子群を網羅的に解析するため、活動状態・乾眠状態・復帰状態のヨコヅナクマムシについて完全長 cDNA ライブラリを構築し、EST 解析によりそれぞれの状態での遺伝子発現プロファイルを明らかにする。乾眠に伴って変動する遺伝子は乾燥耐性に関与する良い候補であり、網羅的に同定する。また、得られた配列データはゲノムアセンブリに利用するほか、ゲノム概要配列上の遺伝子アノテーションを行う際にも活用する。予備実験の結果から、完全長 cDNA ライブラリの構築には約 1 万匹のヨコヅナクマムシが必要と算定された。1 万匹が準備できる毎に各状態の試料を作成してライブラリ構築と EST 解析を行い、最終的に計 3 万匹を使用する。

### <2008 年度の成果>

#### ・ゲノム解析

ゲノム概要配列の決定に向けて、ヨコヅナクマムシ (YOKOZUNA-1 系統) を大量に飼育・増殖させ、これを材料としてゲノム DNA を調製した。クマムシの餌であるクロレラが試料に混入するのを避けるため、ゲノム DNA の調製直前に 2 日間の絶食を行っている。この時、同時に抗生物質を添加することで細菌の繁殖を抑制した。これまでに最終的に 2 万匹超を投入して、ゲノム解読に足る品質の長鎖 DNA を約 2.5 μg 得た。このうち、約 600ng を用いて、支援班の協力を得て fosmid ライブラリの構築を開始した。残りの DNA は Whole Genome Shotgun 解析に供する予定である。

当初、必要量と算定された約 1 万匹のクマムシを約 3 ヶ月かけて準備した後、ゲノム DNA を調製したが、十分な鎖長のゲノム DNA は得られなかった。調製法の検討により、最終的に前段に述べたような DNA を得ることが出来たが、この過程で大量のサンプルが必要となった。そこで、ゲノム調製と並行してクマムシの飼育方法の改良を押し進め、これまでに飼育系の大幅なクリーン化と省力化を実現した。具体的な改善点として最大のものは、次亜塩素酸ナトリウムを用いた卵表面の殺菌工程の追加である。これに基づく飼育作業の効率化により、サンプルの供給能力は年度当初の約 2-3 倍に向上した。

#### ・完全長 cDNA 解析

乾眠状態のクマムシは無代謝でかつ有機溶媒耐性を持つ特殊な

状態である。そこでまず、完全長 cDNA ライブラリの作成に向けて、クマムシでもオリゴキャップ法が機能することを確認する目的で、小スケールのクマムシサンプルを用いて RNA ligase mediated RACE を行った。RACE で増幅する遺伝子としては、いくつかの動物種で乾燥時に発現上昇することが知られている Late Embryogenesis Abundant (LEA) 遺伝子を選んだ。ヨコヅナクマムシの LEA 遺伝子の部分配列は、先に行った小スケールのゲノムショットガン解析の配列データベース中から得られたため、これを元にプライマーを設計し、RACE 法により全長配列を決定した。その結果、3つの LEA\_4 モチーフを持つ約 26kDa の分泌タンパク質をコードしていることが分かった。クマムシ類(緩歩動物門)で LEA 遺伝子が同定されたのは初めての例である。乾眠状態のクマムシから作成した鋳型からも問題なく増幅できたことから、乾眠状態においても完全長の RNA が保存されており、問題なく完全長 cDNA ライブラリを作成できると考えられる。現在、ライブラリの作成に必要なクマムシの準備を進めている。

#### ・ホームページの開設

国内外に向けて乾眠能力を持つクマムシのゲノム解読が進行中であることをアピールするために、クマムシゲノムプロジェクトのホームページを開設した。配列情報・写真・動画などの情報を共同研究者間で共有する目的にも使用している(配列情報等は現在のところ非公開)。

#### <国内外での成果の位置づけ>

クマムシのゲノムとしては、米国で乾燥耐性のほとんど無い種について解読中である。乾燥耐性の高いクマムシのゲノム解読は乾燥耐性の進化的起源について比較ゲノム解析を行う上で重要な位置を占める。しかしながら、乾燥耐性の高いクマムシについては、飼育に必要な労働量が大変大きく、これまで分子生物学的な解析はほとんど行われてこなかった。ヨコヅナクマムシは高い耐性の割に比較的飼育が容易なまれな例であり、ゲノム解析など大規模解析も実現可能な範囲にあるが、それでもなお研究において飼育の占めるウェイトはきわめて大きい。今回成功したヨコヅナクマムシの飼育系の大幅なクリーン化と省力化は、材料確保というクマムシ耐性研究の大きな問題を低減させる成果であると同時に、本邦由来のヨコヅナクマムシをクマムシのモデル種として利用する利点をより増すものである。今回の飼育系の改良はゲノム解析だけでなく、トランスクリプトーム解析など他の大規模解析を促進するものと考えている。

今回、同定した LEA 遺伝子はもともと植物の種子に蓄積するタンパク質として同定された遺伝子であるが、近年、線虫やネムリユスリカなどいくつかの動物においても同定され、乾燥時ストレスに反応して発現上昇することが報告された。クマムシ(緩歩動物)で同定されたのは初めてであり、動物の持つ乾燥耐性機構に共通性があることを示唆しているかもしれない。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ゲノム DNA の抽出法について、小スケールで質・量ともに適した方法を検討した後、ラージスケールの抽出を行ったが、DNA が著しく分解しており、ゲノム解読に十分な品質の DNA を得られなかった。同じ抽出法を用いても抽出結果が大きくばらつくこ

とが多く、必要量のゲノムの抽出は予想外に難航した。このトラブルは、継続的な抽出法の検討と大量のクマムシ個体数の投入により克服することが出来たが、研究計画に約 4 ヶ月の遅延と、予定外のサンプルの大量消費をもたらした。全体の研究計画に与えた影響は大きかったと言わざるを得ない。

年度当初は完全長 cDNA ライブラリを作成し、トランスクリプトーム解析を行う予定であったが、ゲノム解析に想定外の大量のクマムシサンプルの投入が必要となったため、cDNA 解析に用いるクマムシの準備が間に合わず、完全長 cDNA ライブラリを作成するに至らなかった。現在、クマムシ試料の準備を進めており、できるかぎり早急に元の実験計画に復帰する。

#### <今後の課題>

##### ・ゲノム解析

フォスミドライブラリの構築と末端解読、および Whole Genome Shotgun 解析を進め、ゲノム配列のアセンブリを行う。計算機による自動アノテーションを進めるとともに、協力者の募集を呼びかけ、マニュアルアノテーションを行う。

##### ・完全長 cDNA 解析

今年度の実験によりオリゴキャップ法が適用可能であることが分かったため、活動状態・乾眠状態・復帰状態のクマムシ試料を準備し、今回と同様の方法により RNA を抽出する。支援班の協力を得て完全長 cDNA ライブラリの作成、およびペアエンドリードを行う。LEA 遺伝子の場合、5' -UTR が 148b, 3' -UTR が 483b とあまり長くなく、エンドリードにより CDS が解読できる遺伝子も少なくないと予想している。LEA 遺伝子については、乾眠時に発現変動している可能性があることから、転写レベル/翻訳レベルでの発現解析を行うとともに、乾眠への関与を調べるためにタンパク質の性状・機能解析を計画している。

#### <成果公表リスト>

・現在までのところ、なし。

・ゲノムプロジェクトの情報公開・共有サイトとして以下のホームページを開設した。

【クマムシゲノムプロジェクト】

<http://kumamushi.org/>

・フォスミドライブラリの作成につきまして、藤山先生の研究室のご支援をいただきました。