

「低温環境に弱い線虫が氷点下で生き延びた！」  
—新しい低温保存技術と長期常温保存への期待—

### 1. 発表者：

佐々木裕次（東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻 教授

／産総研・東大 先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ  
特定フェロー）

倉持 昌弘（同助教／産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 協力研究員）

津田 栄（産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 上級主任研究員

／産総研・東大 先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ兼務）

### 2. 発表のポイント：

- ◆低温環境下で生存が難しい線虫 *C. elegans*（注1）に氷結合タンパク質分子（注2）を遺伝子導入技術（注3）で発現させると、生存率（注4）が最大で約10倍に上昇することを世界で初めて示しました。
- ◆0℃においても生存率上昇が確認されたことにより、氷結晶があまり存在しない環境においても細胞保護機能（注5）が働いていることを線虫で確認しました。
- ◆氷結合タンパク質を発現する部位（注6）を変えることで生存率上昇の効果が違うので、最適な導入法や他の分子の導入の探索・検討を通じて、移植臓器や食品等の新しい低温保存技術や長期常温保存技術につながることを期待されます。

### 3. 発表概要：

近年、食品ロスが社会問題となっています。食品ロス対策で学術的な貢献が期待されるのは、新しい保存技術の開発です。例えば、冷蔵・冷凍低温保存における賞味期限の延長や、大規模低温保存施設を必要としない保存方法が期待されています。また、食品以外では、臓器移植において、安定な低温保存期間の延長も期待されています。本研究グループは、今まで、氷結晶と強く相互作用する氷結合タンパク質分子（Ice-Binding Protein: IBP）が、どのように氷と結合するのかという分子レベルでの機能発現の解明に着目して研究をしてきました。このIBPは、氷結晶表面に吸着し、氷結晶の成長を空間的に阻害することで、細胞や組織の損傷を防ぐ機能を持つことが分かってきました。しかし、低温下において生きた動物（個体動物）の耐性や、細胞機能に対するIBPのマクロな効果については全く研究されてきませんでした。

東京大学大学院新領域創成科学研究科の佐々木裕次教授（産総研・東大 先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ兼務）、倉持昌弘助教、そして、産業技術総合研究所の津田栄上席主任研究員らは、世界で初めて、IBPの個体動物としての低温耐久性と細胞保護効果について、筋肉系、神経系、そして消化器系において評価し、筋肉系にIBPを発現した場合、マイナス5℃で1日間飼育した時の生存率が野生型で7%だったのに対し、体壁筋にIBPを発現した線虫では、生存率約72%以上に上昇することを定量的に示しました。凍結温度域における氷の結晶成長を抑えることで、線虫生体内へのダメージを防ぎ、個体レベルの活動を維持できることが判明したのです。

### 4. 発表内容：

IBPは“不凍タンパク質”とも呼ばれている物質で、1969年に南極海の魚類から発見されて以来、そのユニークな特性により注目されてきました。その主な機能は、氷結晶表面に吸着し、その成長を

阻害することで細胞や組織の損傷を防ぐ機能です。これまで IBP の分子構造 (図 1) や熱ヒステリシス (注 7) などの特徴が明らかにされてきました。一方、低温下における個体動物の耐性或細胞機能に対する IBP の効果については、全く理解が進んでいませんでした。そこで、個体動物における IBP の機能を評価・解析するため、分子遺伝学的な手法が整備された線虫 *C. エレガンス* を利用することにしました。今回、魚類および菌類由来の IBP をそれぞれ神経、筋肉 (体壁筋)、腸と部位特異的に発現させたトランスジェニック線虫 (注 8) を作製し、これら線虫を低温環境に曝露したときの生存率や細胞を観察することで、生体内における IBP 機能を評価しました。

線虫 *C. エレガンス* は、正式名称は、カエノラブディティス・エレガンス (*Caenorhabditis elegans*) で、カンセンチュウ科に属する線虫の一種です。今までに、3 回ものノーベル賞受賞 (2002 年: プログラム細胞死、2006 年: RNA 干渉、2008 年: 蛍光タンパク質の研究) に関わっています。その回数が見るに及ばぬように、モデル生物として広く利用されてきました。全体が透明な生物で、実験材料として非常に優れた性質を持ち、多細胞生物として世界で初めて全ゲノム配列が解読された生物でもあります。また、ここで取り扱う魚類および菌類由来の IBP は、本研究の発表連名者でもある産業技術総合研究所生物プロセス研究部門の津田栄上級主任研究員らによる長年の IBP 研究において発見されたタンパク質分子群であり、IBP 研究において、初めての生物個体への適応例となりました。

今回の実験では、低温環境に曝露後の線虫生存率を観察するために、卵から成虫になるまでの 3 日間、24 °C の寒天プレート上で飼育し、マイナス 5 °C または 0 °C の低温環境下に 1 日間曝露し、その後室温に戻し、実体顕微鏡下で生存数をカウントしました。典型的な実験結果を (図 2) に示します。マイナス 5 °C で 1 日飼育したときの生存率は、野生型で 7 % だったのに対し、体壁筋に IBP を発現した線虫では生存率 72 % と著しい上昇が見られました。また、IBP を発現した虫の方が、野生型線虫よりも多数の細胞を観察することができ、IBP が細胞損傷を防ぐ細胞保護機能をもつこともわかりました。さらに、0 °C においても有意に生存率の上昇を示すことが確認され、氷結晶があまり存在しない 0 °C の環境においても、IBP が効果を発揮することを確認できました (図 3)。今後は、細胞中の細胞膜など、より微小な部位への発現による一層の耐久性の向上やそのメカニズム解析、他の IBP 分子の利用、より小さい分子の活用の検討、遺伝子導入法を用いない分子導入方法の技術開発を進めていく予定です。

本研究成果は、ネイチャー・パブリッシング・グループ (Nature Publishing Group) 電子ジャーナル「Scientific Reports」のオンライン速報版で 5 月 15 日に公開されました。

なお、本研究は、東京大学と TIA「かけはし」との共同で行われた研究で、新領域を開拓するための研究を支援する事業連携プログラム探索事業「かけはし」研究テーマ「次世代ナノバイオテクノロジー創成を目指した戦略的広域連携プログラム」(研究代表 佐々木裕次教授) として平成 28 年度 (2016 年度) から 2 年間採択された研究です。この TIA と言うのは、国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立研究開発法人物質・材料研究機構、国立大学法人筑波大学、大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構と国立大学法人東京大学の 5 研究機関と、一般社団法人日本経済団体連合会とで運営する研究拠点であり、内閣府、文部科学省、経済産業省の支援を得てオープンイノベーションに繋がる研究開発を推進している研究拠点名です。また、平成 26 年度 (2014 年度) 採択の科学研究費助成事業 新学術領域研究 (研究領域提案型)「3D 活性サイト科学」(領域代表 奈良先端科学技術大学院大学 大門寛教授) の研究課題名「バイオロジーにおける 3D 活性サイト科学」(研究代表 佐々木裕次教授) の支援も受けて本研究は実施されました。

## 5. 発表雑誌：

雑誌名： *Scientific Reports* (オンライン版 5 月 15 日掲載)

論文タイトル： Expression of Ice-Binding Proteins in *Caenorhabditis elegans* Improves the Survival Rate upon Cold Shock and during Freezing

著者： Masahiro Kuramochi<sup>1,2</sup>, Chiaki Takanashi<sup>1,2</sup>, Akari Yamauchi<sup>2</sup>, Motomichi Doi<sup>2</sup>, Kazuhiro Mio<sup>2</sup>, Sakae Tsuda<sup>2</sup>, and Yuji C. Sasaki<sup>1,2</sup> (Corresponding author: M. Kuramochi, S. Tsuda, Y. C. Sasaki) 1 東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻、2 産業技術総合研究所

## 6. 用語解説：

### (注1) 線虫 C. エレガンス

非寄生性の土壌性線虫の1種で、発生生物学や神経科学などで広く用いられるモデル生物。体長 1 mm 程度で、神経、筋肉、腸、生殖器などをもつ線形動物。これまでに3度ノーベル賞受賞に関わっている。1度目は S. Brenner、R. Horvitz、J. E. Sulston によるプログラム細胞死に関する研究 (2002 年)、2度目は A. Fire、C. Mello による RNA 干渉に関する研究 (2006 年)、3度目は M. Chalfie による蛍光タンパク質の研究 (2008 年、O. Shimomura、R. Tsien とともに受賞)。

### (注2) 氷結合タンパク質分子

氷表面に結合してその成長を抑制することができるタンパク質。低温環境に生息する生物から様々な種類の分子が発見されている。魚類由来、微生物由来のものが見つかっており、それぞれ氷との結合様式など異なる性質をもつ。

### (注3) 遺伝子導入

遺伝子工学技術を利用して人為的に作製した DNA 溶液を、線虫の生殖腺に微小な針を使って注入する。DNA を注入した線虫から生まれる子孫の世代では、注入した DNA 由来の遺伝子をもつ線虫が生まれ、その遺伝子は代々受け継がれる。特定の細胞や組織のみに遺伝子を導入することができる。

### (注4) 生存率

線虫を低温環境で1日間飼育した後、生存している線虫の割合。生存率 = (生存している個体数) ÷ (全個体数) により算出。線虫生死は、線虫頭部を白金線で触れたときの反応有無で判断。

### (注5) 細胞保護機能

先行研究において、IBP は氷の存在しない低温でも機能し、細胞生存率を増加させるとの報告はあるが、個体動物の生存率が向上するかどうかはわかっていなかった。また、生存率を改善する IBP の詳細な分子メカニズムについてもよくわかっていない。線虫の細胞観察では、筋細胞核に蛍光タンパク質を遺伝的に発現させ、低温環境で1日飼育後、個々の細胞核を蛍光観察し、正常な形を保つ細胞核を評価した。

### (注6) 氷結合タンパク質を発現する部位

神経、筋肉 (体壁筋)、腸など線虫の特定の組織だけに IBP をもつ。

### (注7) 熱ヒステリシス

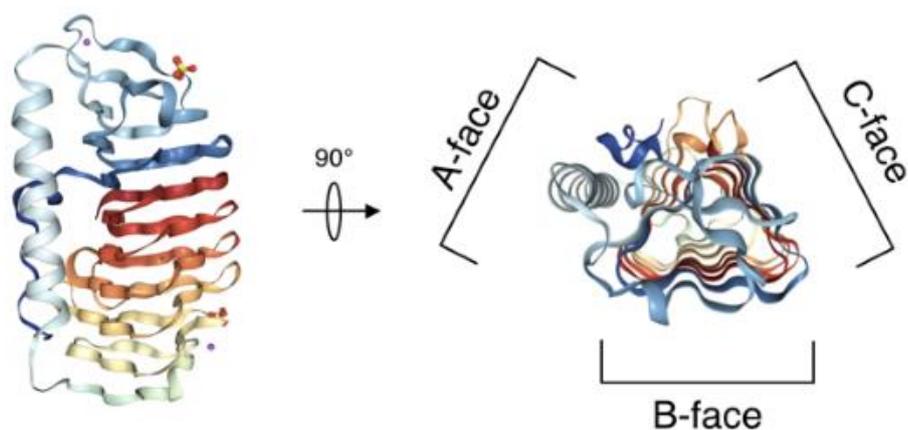
IBP 水溶液における凝固点と融点の温度差のことを指し、IBP の氷結晶結合力の指標として広く用いられている。IBP 水溶液中において、1 個の氷結晶を入れた状態からその氷結晶が溶ける温度 (融

点： $T_m$ ) および結晶成長を開始する温度 (凝固点： $T_f$ ) を測定し、その温度差  $|T_m - T_f|$  を熱ヒステリシスとして定義する。

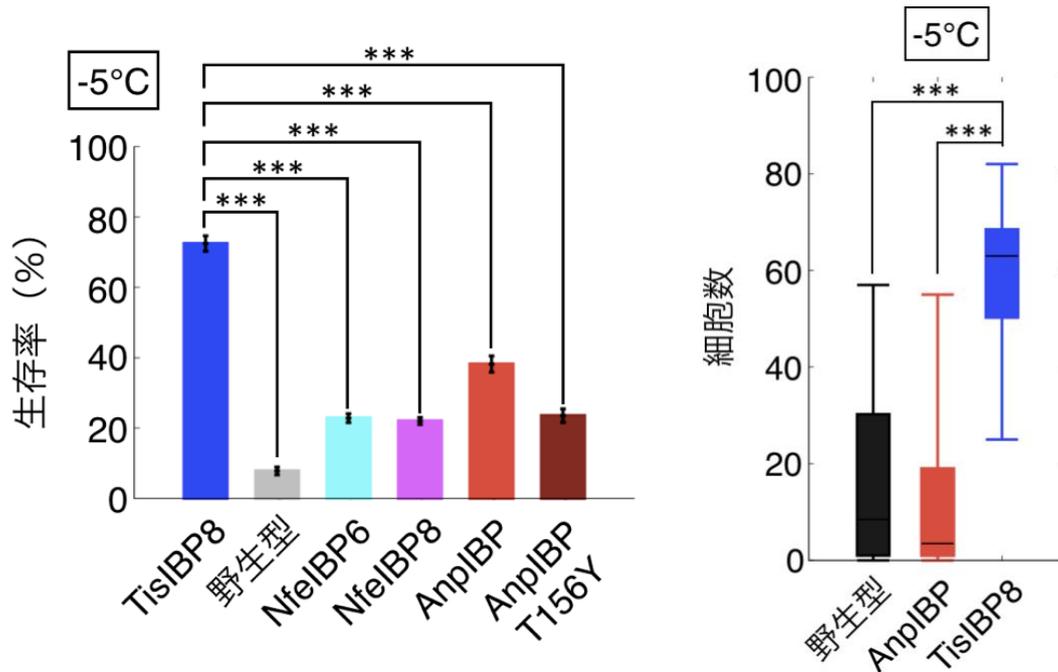
(注8) トランスジェニック線虫

遺伝子導入技術を利用することで、人工的に導入された特定の遺伝子をもつ線虫の総称。

7. 添付資料：

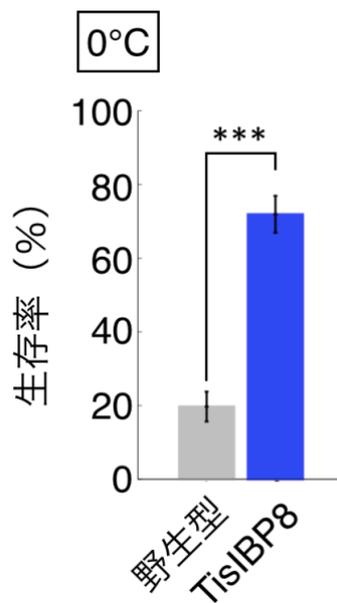


(図1) X線結晶解析で決定された担子菌チフラ・イシカリエンシス (*Typhula ishikariensis*) が産出する氷結合タンパク質 TisIBP8 の分子構造モデル。A-face、B-face および C-face のうち、B-face で氷結晶表面と結合することができる。



(図2) 線虫の低温実験結果

TisIBP8 (担子菌)、NfeIBP6、NfeIBP8 (ゲンゲ科魚類)、AnpIBP および AnpIBP T156Y 変異体 (南極子囊菌) を筋肉にもつトランスジェニック線虫。-5 °C で1日間飼育後、これらトランスジェニック線虫と野生型の生存率 (左図)、細胞数 (右図) を評価した。TisIBP8 をもつ線虫の生存率は72 %であり、野生型の10倍であった (左図)。また、TisIBP8 を発現した線虫は、野生型よりも多数の細胞を観察することができた (右図)。統計的有意差検定から、TisIBP8 をもつ線虫の生存率、細胞数は他のトランスジェニック線虫や野生型と比べて有意に高いことがわかった。※図中の\*\*\*は有意確率  $p$  値 $<0.001$  を表す。



(図3) 線虫の0 °Cにおける生存率。TisIBP8 をもつ線虫の生存率は最大76 %であり、野生型よりも有意に高いことがわかった。