

発表番号 30 (0319)

## マガキ浸透圧応答遺伝子の塩分感受性DNAエレメントの 同定とその機能解析

助成研究者：豊原治彦（京都大学農学研究科）

海洋性無脊椎動物の環境海水の塩分濃度変化に対する応答機構を明らかにする目的で、マガキの細胞内浸透圧調節のためのアミノ酸輸送に関わる輸送タンパク質について、その塩分濃度変化に応答した遺伝子発現の調節機構を調べた。鰓と閉殻筋を対象としたノーザンブロット分析の結果、マガキを高塩分濃度（通常海水の2倍濃度）に暴露すると、細胞内浸透圧を高めるための細胞内へのアミノ酸の輸送を目的として、24時間後に強いこの輸送体遺伝子の新規な転写誘導が認められた。しかし、予想外なことに、高浸透圧暴露時以上に顕著な遺伝子発現が、低塩分濃度（通常海水の半分の濃度）に暴露することによって、8時間以降24時間まで認められた。

このような塩分濃度変化に応答した遺伝子の発現調節機構は、遺伝子のプロモーターと呼ばれる発現調節領域によって規定されていると予想された。そこで、マガキのアミノ酸輸送タンパク質の遺伝子のプロモーター領域約2,300塩基対をクローニングした。プライマーエクステンション解析の結果、転写開始点は、翻訳開始点の165塩基上流にあった。

塩分濃度感受性領域を特定するために、クローニングした領域について最短132塩基から最長2141塩基の様々な長さのプロモーター領域を調製し、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として組み込んだ発現ベクターを作製した。これらベクターをHEK-293T細胞にトランスフェクトし、培地の浸透圧を変化させることで塩分ストレスを与えたところ、すべてのベクターが、通常塩分濃度（300ミリオスモル）の場合に比べて、高塩分濃度（500ミリオスモル）及び低塩分濃度（200ミリオスモル）において強い発現誘導活性を示した。この結果から、もっとも短い領域内（転写開始点から132塩基上流）に、塩分濃度変化に応答して遺伝子発現を誘導するエレメントが存在することが示唆された。さらに、塩分濃度に応答したエレメント配列を同定するためにDNAaseフットプリント解析を行ったが、最終的にエレメント配列を同定するには至らなかった。今後は、132塩基よりさらに短いプロモーター領域からなる発現ベクターを構築し、塩分濃度を関知するセンサー遺伝子配列の特定を進めていきたいと考えている。



20

助成番号 0319

## マガキ浸透圧応答遺伝子の塩分濃度感受性DNAエレメントの 同定とその機能解析

助成研究者：豊原治彦（京都大学農学研究科）

### 1. 研究目的

海洋無脊椎動物のようないわゆる浸透調節動物は、環境海水の浸透圧変化に適応するために細胞内のオスモライト（細胞内浸透圧を調節するための無害な糖、アミノ酸、窒素化合物などの低分子性有機物の総称）の濃度を調節するメカニズムを有する<sup>1)</sup>。低浸透圧環境においては、細胞はオスモライトを細胞外に放出することにより、細胞内の浸透圧を減少させる一方で、高浸透圧環境においては細胞内にオスモライトを取り込む。海洋性二枚貝ではアミノ酸が細胞内浸透圧調節に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>2)</sup>。

太平洋マガキ（Pacific oyster、以下マガキ）は世界中のカキ生産額の80%を占める重要種であり<sup>3)</sup>、世界各地の養殖場に導入されている<sup>3,4)</sup>。自然界においてマガキは汽水域に生息していることから、広い浸透圧適応能力を有することが予想される<sup>5-7)</sup>。最近になって、私たちの研究グループは、マガキがアミノ酸をオスモライトとして利用することで、幅広い浸透圧変化に応答していることを示した<sup>8)</sup>。

おもに哺乳類についての研究から、オスモライトの細胞からの放出や細胞内への取り込みに関わる膜タンパク質が明らかにされてきた。低浸透圧環境下では、オスモライトは非選択性のチャネルを介して細胞外へと放出される<sup>9)</sup>。一方、細胞内への取り込みは各オスモライトに特異的なトランスポーターを介して行われる<sup>10,11)</sup>。

魚類においては、細胞レベルの浸透圧応答は特に上皮細胞において重要である。私たちの研究グループは、浸透圧応答性遺伝子としてコイとティラピアにおいてタウリントランスポーター遺伝子を同定し、そのタウリン取り込み活性をCOS-7細胞において証明した<sup>12,13)</sup>。さらに、タウリントランスポーターがティラピアのヒレの上皮細胞において発現していることも明らかにした<sup>13)</sup>。

一方、海洋無脊椎動物のオスモライトの輸送機構については不明な点が多い。最近、私たちの研究グループは、種々のアミノ酸に対して幅広い輸送活性を示すアミノ酸トランスポーターの遺伝子をマガキから単離することに成功した。本研究においては、このマガキアミノ酸トランスポーター遺伝子の塩分濃度変化に応答した発現を検討するとともに、その発現調節領域の同定を目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験材料

マガキ (Pacific oysters, *Crassostrea gigas*) は生きたものを養殖業者から購入した。その他用いた試薬などは特級品を使用した。

### 2.2 高・低浸透圧への暴露

マガキは購入後少なくとも1週間、人工海水 (以下100%人工海水、マリンメリット、松田) に対し無給餌で順化させた。約20個のマガキを50リットルの水槽で飼育した。水温は15℃に保った。

マガキを低浸透圧に暴露する場合には、100%人工海水に順化させたマガキを50%人工海水へと移すことによった。高浸透圧に暴露する場合には、50%人工海水に順化させたマガキを100%人工海水へと移すことによった。貝が貝殻を閉じることで、貝殻の内外の海水の交換が妨げられるのを防ぐために、貝殻の端の部分を10×5mm程度ペンチで欠いた。マガキに0, 2, 8, 24時間浸透圧ストレスを与え、ノーザンプロット分析に使用した。

### 2.3 ノーザンプロット分析

分子生物学的実験手法については、定法にしたがった<sup>14)</sup>。全RNAは、鰓と外套膜から塩酸グアニジン抽出と超遠心分画法によった。各レーンあたり全RNAを10μgずつ泳動し、アミノ酸トランスポーター遺伝子の一部をPCRにより増幅して作製したプローブを用いてノーザンプロット分析を行った。PCRは95℃で30秒、42℃で1分、72℃で2分の反応を30サイクル行った。用いたプライマーは、以下の通りである。

5'-CGGAATTCGGNAAYGTNTGGAGRTTYCC-3'

5'-CGGAATTCGTNCCNGCRTCNCATCCANAC-3'

ハイブリダイゼーションは<sup>32</sup>Pで標識したプローブを含んだ5×SSC中で42℃で行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターを室温で2×SSCで洗浄後、さらに68℃において0.5%SDSを含む2×SSCで洗浄し、オートラジオグラフィーに供した。

### 2.4 プロモータークローニング

マガキのDNAは鰓から調製した。5'非翻訳領域はGenome Walker Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) を用いてクローニングした。

### 2.5 プライマーエクステンション

転写開始点を特定するため、Primer Extension System-AMV Reverse Transcriptase Kit (Promega) を用いて、鰓から調製した精製したmRNAを用いてプライマーエクステンシ

ンを行った。用いたプライマーの配列は次の通りである。

5'-TTCTGGAGATTAATGTAGTCAAATAC-3'

この配列は翻訳開始点の 1-26 塩基上流に相当する。

## 2.6 浸透圧変化に応答したプロモーター活性の測定

プロモーター活性はルシフェラーゼをレポーターとして測定した。PCRにより長さの異なる6種類の領域 (Proms. 1-6) を増幅し、pGL3-Basic Vector (Promega) に組み込んだ。これらのベクターを LIPOFECTAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて HEK-293T 細胞にトランスフェクトした。HEK-293T 細胞は 10% のウシ胎児血清を含む浸透圧 300mOsm/Kg の MEM (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) で培養した。この細胞を 24 時間後に、高 (500 mOsm/Kg)、低 (200 mOsm/Kg) 浸透圧の培地に移すことで、浸透圧ストレスを与えた。培地の浸透圧は NaCl を添加することで調整した。培地の浸透圧は、Knauer semi-micro osmometer (Knauer, Berlin, Germany) を用いて測定した。

浸透圧ストレスを与えて 6 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて検出した。蛍光強度は 1420 ARVO™ SX-FL (Wallac, Turku, Finland) を用いて測定した。統計処理 Excel X (Microsoft) を用いた *t*-test によった。有意差検定は  $P < 0.05$  で行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 高・低浸透圧に応答したマガキアミノ酸トランスポーター遺伝子の発現

Fig. 1 に示すように、鰓と閉殻筋の mRNA は、環境浸透圧の上昇・下降に応答して増加した。もっとも顕著な発現誘導は、いずれの組織においても、高浸透圧暴露では 6 時間後に、低浸透圧暴露では 8 時間後に認められた。興味深いことに、高浸透圧より低浸透圧に暴露したときに、より急激で顕著な発現誘導が観察された。この結果は、この遺伝子の上流領域に高・低両浸透圧に応答するプロモーター配列が含まれていることを示唆していた。そこで、私はこの遺伝子の発現調節領域を特定するため、5' 上流域のクローニングを行った。

### 3.2 マガキアミノ酸トランスポーターの 5' 上流域のクローニング

5' 上流域 2,306 塩基対をクローニングし、プライマーエクステンション実験より転写開始点を決定したところ、転写開始点は、翻訳開始点の 165 塩基上流にあることがわかった。したがって、私が得たのは転写開始点 2,141 塩基上流に相当する。

モチーフ解析の結果、Fig. 2 に示すように CREB や C/EBP などの様々なエレメントの存在が明らかとなった。さらにヒートショックエレメント (NGAANN TTCN)<sup>15)</sup> が転写開

始点の 537 塩基, 905 塩基及び 939 塩基上流の三ヶ所に、また低酸素応答エレメント (A/GCGTG)<sup>16,17</sup> が 転写開始点の 1,657 塩基, 1,670 塩基及び 1,784 塩基上流に三ヶ所存在した。この結果は、マガキのアミノ酸トランスポーター遺伝子が、浸透圧以外の様々なストレスに 応答して発現する可能性を示唆していた。

高浸透圧応答エレメント (TonE, TGGAAAAGTCCA) が、Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞においてベタイントランスポーターの 5' 上流域に検出されている<sup>18)</sup>。TonE は、アルドースレダクターゼやミオイノシトールトランスポーター遺伝子の 上流域にも検出された<sup>19-21)</sup>。この配列は、今回クローニングされたマガキアミノ酸トランスポーターでは検出されなかったが、さらに上流域やあるいはコード領域よりさらに下流域に存在するのかもしれない。

### 3.3 浸透圧応答性のプロモーター領域の特定

長さの異なるプロモーター領域 Proms. 1-6 を pGL3-Basic Vector に挿入した。HEK-293T 細胞にこれらのベクターをトランスフェクトし、浸透圧変化に対するレポーター遺伝子の発現を調べた。その結果、Proms. I-VI を挿入したすべてのベクターが高・低浸透圧ストレスに 応答して、等調な培地より高い活性を示した (Fig.3)。もっとも短い転写開始点上流 132 塩基 しか含まない Prom. I を挿入したベクターが高・低浸透圧に 応答性を示したことから、浸透圧に 応答した遺伝子発現を調節するエレメントは転写開始点上流 132 塩基以内に 含まれているとことが明らかとなった。

水中に生活する動物は、環境水の浸透圧変化の影響を受ける。特に、体液浸透圧を内分泌機能により調節する能力を欠いている海洋無脊椎動物は、個々の細胞レベルで環境水の浸透圧変化に 応答しなくてはならない。これらの細胞はオスモライトと総称される低分子有機物質 (糖、アミノ酸、有機アミン類など) を細胞内に蓄積し、その量をコントロールすることで細胞内の浸透圧を細胞外と等しくし、細胞容積の変化を防いでいる。高浸透圧に 応答する場合には、細胞内の浸透圧を高めるためにそれぞれのオスモライトに特異的な輸送能力をもつトランスポーターを介して細胞外から細胞内へと輸送する<sup>10,11)</sup>。一方、低浸透圧に 応答する場合には、細胞内のオスモライトを非特異的なチャネルを通して細胞外へと放出する<sup>9)</sup>。実際に、魚類の上皮細胞や哺乳類腎臓の上皮細胞は高浸透圧に 応答してオスモライトのトランスポーター遺伝子を発現することが報告されている<sup>10-13)</sup>。

このような脊椎動物のトランスポーターとは異なり、本研究において私は、マガキのアミノ酸トランスポーター遺伝子が、高浸透圧ストレスだけでなく低浸透圧によっても発現誘導されること示した。同様の現象を、私はムラサキイガイのタウリントランスポーター遺伝子の発現誘導においても認めている<sup>22)</sup>。したがって、低浸透圧に 応答したオスモライトトランスポーター遺伝子の発現は、汽水域に生息する海洋性二枚貝に共通に認められる現象なのかもしれない。

浸透圧応答エレメントを同定するために、私はマガキのアミノ酸トランスポーター遺伝子の上流域をクローニングし、高・低浸透圧応答性が転写開始点から132塩基以内に存在することを明らかにした。私はDNAase foot print 分析により、これらのストレスに応答する塩基配列を特定しようと試みたが、残念ながら特定には至らなかった。今後、132塩基よりさらに短い領域を挿入した発現ベクターを作製し、浸透圧応答エレメントの存在領域を絞り込んで行く必要があると考えている。

## 参考文献

- 1) Yancy PH, Clark ME, Steven CH, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 1982; **217**: 1214-1222.
- 2) Somero GN, Bowlus R.D. (1983). *Osmolyte and metabolic end products of mollusks: the design of compatible solute systems*. In: Hochachka PW (ed). *Mollusca Vol. 2*. Academic Press, New York. 1983; 77-100.
- 3) Chew KK. *Global bivalve shellfish introductions*. World Aquacult. 1990; **21**: 9-22.
- 4) Shatkin G, Shumway SE, Hawes R. Considerations regarding the possible introduction of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to the Gulf of Maine: a review of global experience. *J. Shellfish Res.* 1997; **16**: 463-478.
- 5) Galtsoff PS. *The American oyster Crassostrea Virginia Gmelin*. United states Government printing Office, Washington. 1964.
- 6) Galtsoff PS, Merrill AS. Notes on shell morphology, growth, and distribution of *Ostrea equestris* Bay. *Bull. Mar. Sci.* 1962; **12**: 234-244.
- 7) Calvo GW, Luckenbach MW, Allen SK, Burreson EM. Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea virginia* (Gmelin, 1791) in relation of salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.* 1999; **18**: 465-473.
- 8) Hosoi M, Kubota S, Toyohara M, Toyohara H, Hayashi I. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fish. Sci.* 2003; **69**, 395-340.
- 9) Pearlman DF, Goldstein F. Organic osmolyte channels n cell volume regulation in vertebrates. *J. Exp. Biol.* 1999; **283**: 725-733.
- 10) Yamauchi A, Uchida S, Kwon HM, Preston AS, Robey RB, Garcia-Perez A. Cloning of a Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 649-652.
- 11) Ferraris JD, Byrg MB, Williams CK, Peters EM, Garcia-Perez A. Betaine transporter cDNA cloning and effect of osmolytes on its mRNA induction. *Am. J. Physiol.* 1996; **270**: 65-654.
- 12) Takeuchi K, Toyohara H, Sakaguchi M. A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell

encodes Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent high affinity taurine transporter. *Biochim. Biophys. Acta* . 2000; **1464**: 219-30.

13) Takeuchi K, Toyohara H, Kinoshita M, and Sakaguchi M. Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation. *Fish Physiol. Biochem.* 2001; **23**: 1-10.

14) Sambrook J, Russel DW, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

15) Fernandes M, O'Brien T, Lis JT. Structure and regulation of heat stress gene promoters. In: Morimoto RI, Tissieres A (eds). *The biology of heat stress proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1994; 375-393.

16) Miyazaki K, Kawamoto T, Tanimoto K, Nishiyama M, Honda H, Kato Y. Identification of functional hypoxia response element in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 47014-47021.

17) Nikinmaa M. Oxygen dependent cellular functions-Why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comp. Biochem. Physiol.* 2002; **A133**; 1-16.

18) Takenaka M, Preston H, Kwon M, Handler JS. The tonicity-sensitive element that mediates increased transcription of the betaine transporter gene in response to hypertonic stress. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 29379-29381.

19) Daoudal S, Tournaire C, Halere A, Veyssiere G, Jean C. Isolation of the mouse aldose reductase promoter and identification of a tonicity-responsive element. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 2615-2619.

20) Ko BC, B. Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, and Chung SS. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 16431-16437.

21) Rim JS, Atta MG, Dahl SC, Berry GT, Handler JS, Kwon HM. Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple tonicity-responsive enhancers spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 20615-20621.

22) Toyohara H, Hosoi M. The role of taurine in the osmotic adaptation in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biotech.* 2004: *in press*.

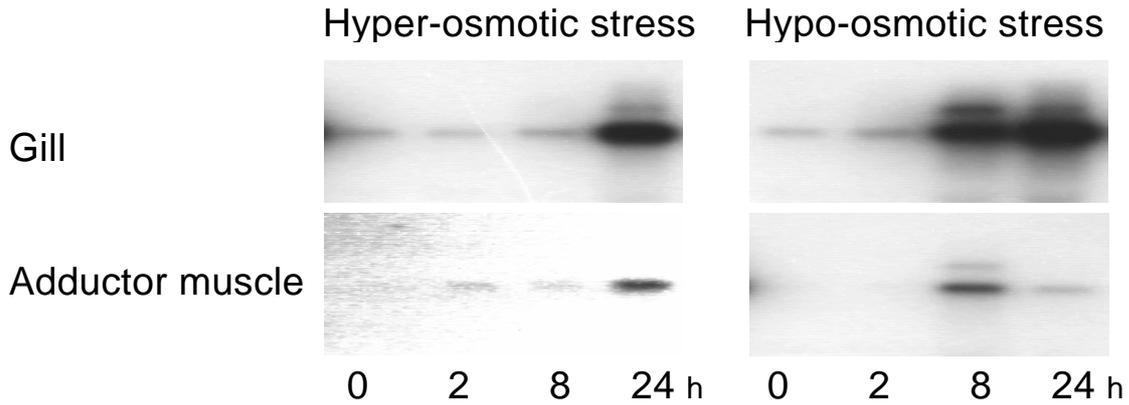


Fig.1 Northern blot analysis on the expression of oyster amino acid transporter responding to osmotic changes.

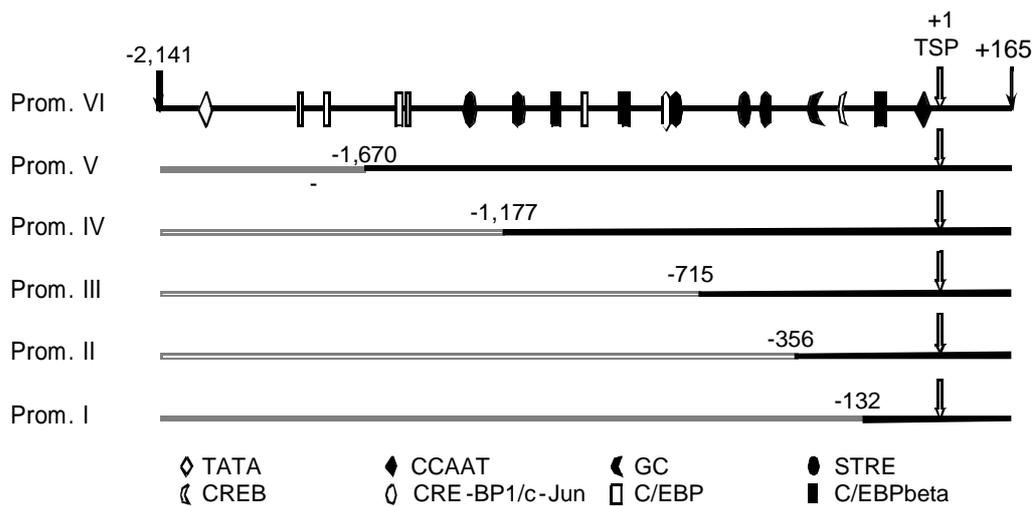


Fig.2 Results of promoter sequence motif search and various deletion mutants of the 5' flanking region of oyster amino acid transporter gene. Various deletion mutants (Proms. I-VI) were amplified by PCR and ligated in pGL-3 Basic vector. Details are described in the text. TSP means "transcription start site". Translation start site localizes 165 bp downstream of TSP.

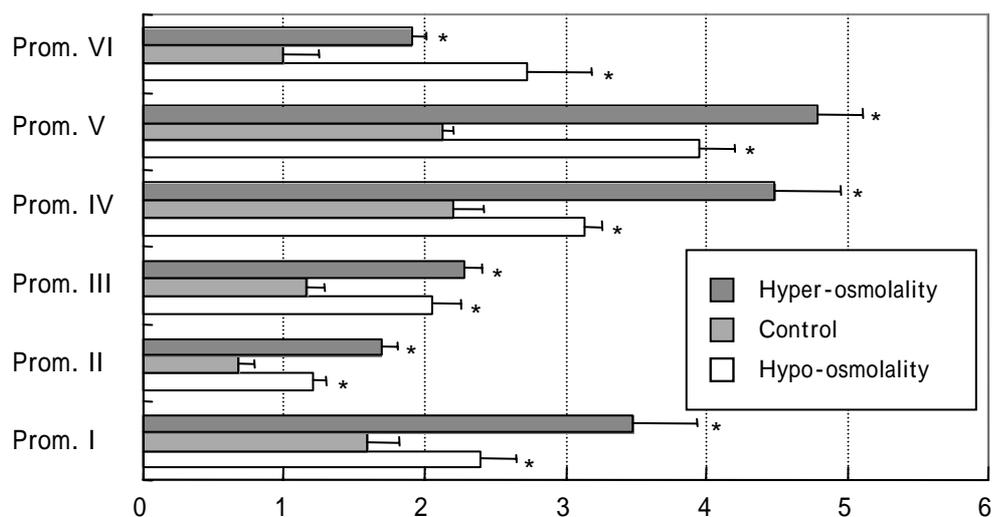


Fig.3 Promoter activity assay of the various deletion mutants responding to the osmotic changes. Vectors was transfected in HEK293T and cells exposed against hypo- and hyper osmotic stresses by changing the medium. Promoter activity was evaluated as a luciferase activity, which is expressed as an arbitrary unit. One unit of the activity is defined as the activity of Prom. VI without osmotic stress. Horizontal bars show the standard errors. Significant differences ( $P < 0.05$ ) from the values of each control are represented by “\*”.

## **Identification and Functional Analysis on the Salt-Sensitive Element of Oyster Osmo-Responsive Gene**

**Haruhiko Toyohara**

**Graduate School of Agriculture, Kyoto University**

### **Summary**

In order to elucidate the implication of amino acid transporter against osmotic adaptation, we investigated the expression of oyster amino acid transporter gene in response to the environmental osmotic changes. When oysters were exposed to hyper-osmotic stress, the expression of the amino acid transporter gene was increased to elevate the intracellular osmolality as expected from the amino acid importing function. Unexpectedly, expression was increased by hypo-osmotic stress as well and the degree of expression was more intense than that by hyper-osmotic stress.

To elucidate the regulatory region on the salt-sensitive expression of the oyster amino acid transporter gene in response to the changes in environmental osmolality, we cloned the approximately 2.3 kb upstream region from the translation start site. Then, we constructed the expression vectors with a luciferase as a reporter gene driven by a different length of the 5'-flanking region. Then, we compared their promoter activity in order to identify the regulatory region in response to the osmotic stresses. As a result, the salt-responsive regulatory region responding to both hyper- and hypo-osmolality is restricted within 132 bp from the transcription start site.