

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200043

研究課題名（和文） 極限環境耐性動物クマムシが獲得した耐性メカニズムの解明

研究課題名（英文） *In vivo* molecular analysis of tolerant ability in tardigrades

研究代表者

國枝 武和 (KUNIEDA TAKEKAZU)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：10463879

研究成果の概要（和文）：

クマムシは外界の乾燥に応じて脱水し、無代謝の乾眠状態となって様々な極限環境に耐性を示すが、その分子機構はほとんどわかっていない。本研究ではクマムシ類で初めての変異体としてヨコヅナクマムシの色素欠損変異体を単離し、同変異体で放射線耐性能が低下していることを明らかにした。さらに、網羅的な配列解析と野生型との配列比較により変異遺伝子を明らかにするとともに、野生型に含まれる色素類の性状を明らかにした。クマムシの耐性能力について変異体解析を行った初めての成果である。

研究成果の概要（英文）：

Tardigrades enter an ametabolic dehydrated state called anhydrobiosis upon desiccation and tolerate various extreme environmental stresses in such a state. The molecular mechanisms of the tolerant ability remain unknown and no *in vivo* analyses have been conducted. Here, we isolated pigment-deficient mutant of anhydrobiotic tardigrade for the first time and revealed that the mutant is more sensitive to radiation stress than wildtype animal. Massive sequencing and comparison with the wildtype genome revealed multiple mutated genes. Furthermore, we characterized the property of the pigments of wildtype tardigrades and these pigments could be good clues to support radiation tolerance in animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：極限生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：極限環境耐性、クマムシ、次世代シーケンサー、変異体

## 1. 研究開始当初の背景

クマムシは外界の乾燥に応じて脱水し、無代謝の乾眠状態となって乾燥に耐える。乾眠状態のクマムシは様々な極限環境に耐性を

示す。本研究では、クマムシの極限環境耐性を支える基盤として乾眠能力に着目し、そのメカニズムの解明を目的とする。これまでのクマムシの乾眠の分子機構の解析は、乾燥時

に変動する分子が数種報告されているだけであり、変動する分子が実際に耐性に関与しているかについては全く検証されていなかった。他の動物種の中にも乾眠能力を持つものがあるが、こうしたものでも同様の状況であり、*in vivo*における耐性メカニズムの解析は全く進んでいない。これらの動物は、遺伝マーカーの蓄積がほとんど無いという、交配せずに増殖（単為生殖）するものが多いことから、古典的な遺伝学（連鎖解析）の適用が困難であったことが大きな原因の一つと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、近年著しい進化を遂げている次世代シーケンサーを利用し、変異体について網羅的な配列解読を行うことで変異遺伝子を同定し、クマムシのような連鎖解析を利用できない生物への変異体解析の拡張を試みる。これによりクマムシの耐性能力を制御する分子を同定し、これまで解析が不可能もしくは困難だった *in vivo* における耐性メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物と変異体の単離

実験動物としてゲノム解読が行われたヨコヅナクマムシの純系統 YOKOZUNA-1 を用いた。同種の成体は茶色の体色を示す。スクリーニングに供するために同系統の大量繁殖を行なっている過程で白色の個体が見出された。白色固体の繁殖は野生型と同様に行い、18S rDNA の配列を PCR で増幅し野生型と同じ種であることを確認した。

### (2) 耐性能力

野生型および変異体を相対湿度 33% に暴露して乾眠への移行を誘導した。乾眠個体に給水し、24, 48 時間後の生存率を測定した。紫外線耐性については活動状態のクマムシを 0-216mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線を照射し、24, 48 時間後の生存率を測定した。ガンマ線についてはコバルト 60 照射装置を用いて、0-6000Gy のガンマ線を照射し、24, 48 時間後の生存率を測定した。

### (3) 変異遺伝子の同定

野生型、色素欠損変異体双方から total RNA を抽出し、イルミナ GAI1 を用いてそれぞれ約 4Gb の配列解読を行った。得られた配列をドラフトゲノムにマップした結果を基に変異箇所を探索した。

### (4) 色素の抽出と性状解析

野生型と変異体の粗抽出液を出発材料として、水層-有機層の分配および薄層クロマトグラフィー (TLC) による分離を行い、野生型に特有のスポットを回収した。得られたスポットについてスペクトル解析および pH 感

受性を解析した。また、TLC により既知の標準物質との照合を行った。

## 4. 研究成果

ゲノム解読が進行中であったヨコヅナクマムシの単一個体由来する YOKOZUNA-1 系統を用いた。ヨコヅナクマムシは交配せずに産卵が可能であること、およびこれまでに精巢が見出されていないことから、生殖様式は産雌性単為生殖と考えられているが、遺伝様式として、クローナルな繁殖を行うか、減数分裂を伴うかは不明であった。

変異体解析を行うために、YOKOZUNA-1 系統の大量飼育を行なっていたところ、偶然、色素を欠損した個体を見出した。野生型の YOKOZUNA-1 は成体で茶色の体色を呈するが、単離した色素欠損個体は成体においても完全に白色であった。同個体の子孫はいずれも体色が白色の表現型を示したことから、色素を欠損した自然突然変異系統を樹立できたと判断した。緩歩動物門において変異系統が樹立されたのは初めての例である。樹立系統からは白色個体しか生まれないことから、ホモ接合型か、クローナルに繁殖しているかのいずれかと考えられた。

同変異体についてクマムシの極限環境耐性能が変化している可能性を検討するために、まずもっとも代表的な乾燥耐性能について解析した。低湿度曝露により乾眠を誘導したのち給水し、24, 48 時間後の生存率を測定した結果、変異体と野生型で顕著な差は見出されなかった。一方、紫外線曝露後の生存率を解析した結果、最高線量の 216mJ/cm<sup>2</sup> を照射した群では、野生型がほぼ 100% 生存したのに対し、変異体では 40% 程度に生存率が低下した。このことから色素欠損変異体は紫外線に感受性になっていることが判明した。野生型とアルビノ変異体の粗抽出液について吸収スペクトルを調べた結果、野生型の方が UV 領域での吸収が高かったことから、ヨコヅナクマムシの持つ色素が UV 吸収性を持ち、これが紫外線に対する耐性に違いを生み出している可能性が考えられた。ガンマ線についても同様に耐性を解析した結果、変異体は野生型よりも感受性が高く、より低い線量で生存率が著しく低下することが分かった。ガンマ線は透過力が非常に高いことから、色素による吸収や遮蔽は考えにくく、ガンマ線照射によって発生した活性酸素ストレスへの抵抗性が異なっている可能性を想定している。

変異遺伝子の同定については、野生型のゲノム配列がドラフトの段階であることを鑑みて、全ゲノム比較ではなく、発現している遺伝子に着目したトランスクリプトーム比較を行った。野生型および変異体について解読した約 4Gb の配列をドラフトゲノムにマップした結果、複数の変異遺伝子を同定した。

これらの変異がゲノムに生じていることをサンガー法により確認した。変異が確認された遺伝子の中に、色素合成経路で働くことが知られている遺伝子が1つ含まれていることが判明した。変異部位は機能ドメインには含まれていなかったが、立体構造を構築する上で重要と考えられる領域にあり、立体構造変化による機能喪失型の変異と考えられた。また、ヨコヅナクマムシは細胞あたりの DNA 量と解読したゲノム配列との比較から 2n の核相を持つとかがえられるが、アルビノ変異体の配列解析において同変異部位のヘテロ接合性は検出されず、ホモ接合体と考えられた。このことからヨコヅナクマムシは単一個体から無交配で産卵可能であるが、生殖細胞形成時に減数分裂を伴っている可能性が高いと考えられ、人為的な変異誘発時においてもスクリーニング系を考慮することで劣性変異体の分離も可能と考えられる。

同定した変異遺伝子の結果をもとに野生型に含まれる色素の種類を推定し、野生型ヨコヅナクマムシから色素の精製を進めた結果、分離過程での挙動や精製品の吸光スペクトルおよび pH への応答性から、クマムシの色素は変異遺伝子の下流で合成される色素の性質と一致したことから、この遺伝子変異がアルビノ形質の原因遺伝子と考えられた。そこで、同色素グループについて入手可能な各種の色素標品を集めるとともに、標品が入手できないものについては他種動物より色素を抽出し、ヨコヅナクマムシの色素と吸光スペクトルおよび TLC での移動度を比較したが、一致する既知の色素は見出されておらず、クマムシの色素は固有の修飾を受けている可能性が考えられた。

以上の変異体解析と生化学的解析の融合により、クマムシの高い放射線耐性を支える分子実体としてヨコヅナクマムシの色素およびその代謝産物が良い候補であることを見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Yamaguchi A, Tanaka S, Yamaguchi S, Kuwahara H, Takamura C, Imajoh-Ohmi S, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T and Kunieda T. Two Novel Heat-Soluble Protein Families Abundantly Expressed in an Anhydrobiotic Tardigrade. PLoS ONE 7, e44209 (2012) 査読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0044209
- (2) 國枝武和、緩歩動物クマムシの乾眠能力

と極限環境耐性、生物科学、63, 205-213 (2012) 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- (1) 山口志保、ヨコヅナクマムシにおいて大量に発現する新規な熱可溶性タンパク質 CAHS, SAHS の解析第 13 回極限環境微生物学会年会 2012/12/1-2 東京(日本大学)
- (2) 伊藤麻紀子、乾燥耐性の異なる複数のクマムシ種における熱可溶性タンパク質の解析第 13 回極限環境微生物学会年会 2012/12/1-2 東京(日本大学)
- (3) Kunieda T. Genome annotations and transcriptomic analysis in *Ramazzottius varieornatus*. 12th International Symposium on Tardigrada 2012/7/23-26 Porto (Portugal)
- (4) Tanaka S. Two families of novel abundant heat-soluble proteins in an anhydrobiotic tardigrade. 12th International Symposium on Tardigrada 2012/7/23-26 Porto (Portugal)
- (5) Hashimoto T. Proteomic analysis of chromatin fraction in an anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*. 12th International Symposium on Tardigrada 2012/7/23-26 Porto (Portugal)
- (6) 伊藤麻紀子、乾燥耐性の異なる複数のクマムシ種における熱可溶性タンパク質の解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011/12/16、横浜(パシフィコ横浜)
- (7) 橋本拓磨、ヨコヅナクマムシにおけるクロマチン分画タンパク質の解析、極限環境生物学会第 12 回年会、2011 年 11 月 27 日、長崎(長崎大学・良順会館)
- (8) 山口志保、ヨコヅナクマムシの大量発現遺伝子がコードする新規タンパク質 A1 の解析、極限環境生物学会第 12 回年会、2011 年 11 月 27 日、長崎(長崎大学・良順会館)
- (9) 國枝武和、極限環境耐性動物クマムシのゲノム解析と機能プロテオミクス、沖縄知的クラスター形成シンポジウム(招待講演)、2011 年 1 月 29 日、那覇(沖縄産業支援センター)
- (10) 桑原宏和、ヨコヅナクマムシにおけるアルビノ変異体の極限環境耐性、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 10 日、神戸(神戸国際展示場)
- (11) 國枝武和、極限環境耐性動物クマムシの分子生物学的解析基盤の創成、第 11 回極限環境生物学会(奨励賞受賞講演)、2010 年 11 月 16 日、京都(京都大学・きはだホール)
- (12) 國枝武和、極限環境耐性動物ヨコヅナク

マムシ由来の抗凝集性タンパク質の解析、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 25 日、東京（東京大学・駒場キャンパス）

- (13) 桑原宏和、ヨコヅナクマムシにおけるアルビノ変異体の極限環境耐性、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京（東京大学・駒場キャンパス）
- (14) 片山俊明、Construction of the genome database and draft genome sequence analysis of tardigrada、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 11 日、横浜（パシフィコ横浜）
- (15) 桑原宏和、Identification of an albino mutant strain in brown anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius* cf. *varieornatus*、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 11 日、横浜（パシフィコ横浜）
- (16) 國枝武和、Genome analysis and functional proteomics of anhydrobiotic extremotolerant tardigrade, *Ramazzottius* cf. *varieornatus*、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、横浜（パシフィコ横浜）
- (17) 山口理美、The analysis of anti-aggregation proteins from tardigrades with desiccation tolerance、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日、横浜（パシフィコ横浜）
- (18) 國枝武和、極限環境耐性動物クマムシのゲノム解析、第 10 回極限環境微生物学会、2009 年 10 月 29 日、東京（明治大学駿河台キャンパス・アカデミーコモン）
- (19) 桑原宏和、極限環境耐性動物ヨコヅナクマムシにおけるアルビノ変異株の単離、第 10 回極限環境微生物学会、2009 年 10 月 29 日、東京（明治大学駿河台キャンパス・アカデミーコモン）
- (20) 山口理美、乾燥耐性を持つクマムシ由来の抗凝集性タンパク質の解析、第 10 回極限環境微生物学会、2009 年 10 月 28 日、東京（明治大学駿河台キャンパス・アカデミーコモン）
- (21) 國枝武和、The tardigrade genome of an anhydrobiotic extremotolerant species, *Ramazzottius varieornatus*、3rd International Symposium on the Environmental Physiology of Ectotherms and Plants、2009 年 8 月 24 日、筑波（文部科学省研究交流センター）
- (22) 國枝武和、The tardigrade genome of an anhydrobiotic extremotolerant species, *Ramazzottius varieornatus*、11th International Tardigrade Symposium、2009 年 8 月 5 日、テュービンゲン・ドイツ

- (23) 片山俊明、Draft genome sequence assembly and preliminary annotations of *Ramazzottius varieornatus* genome、11th International Tardigrade Symposium、2009 年 8 月 5 日、テュービンゲン・ドイツ
- (24) 堀川大樹、Life history of the tardigrade *Ramazzottius varieornatus* under artificial culture conditions、11th International Tardigrade Symposium、2009 年 8 月 5 日、テュービンゲン・ドイツ

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/saibou/kuma/>

アウトリーチ活動  
一般向けイベントとして、ミネゲノムひろば（2009 年 12 月 20 日、福岡）、動物学ひろば（2010 年 9 月 25 日、東京）にて、展示を行った。また、日本動物学会関東支部・公開講演会にて、『驚異の生命-宇宙を目指す動物たち-』と題した講演を行った。

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
國枝 武和 (KUNIEDA TAKEKAZU)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号：10463879