

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22681029

研究課題名(和文) マルチオミクス解析によるクマムシの乾燥耐性・極限環境耐性分子機構の解明

研究課題名(英文) Multi-omics study to elucidate the molecular mechanism of anhydrobiosis in tardigrade *Ramazzottius varieornatus*

研究代表者

荒川 和晴 (Arakawa, Kazuharu)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任講師

研究者番号：40453550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：陸生のクマムシの多くは周囲の環境の乾燥により、ほぼ完全な脱水を伴って生命活動を可逆的に停止する「乾眠」という機構を持つが、その分子機構は未だ明らかではない。そこで、本研究ではヨコヅナクマムシ乾眠前後の主にメタボロームとリン酸化プロテオームによるマルチオミクスにより、有意に変動を示す鍵分子を特定すると共に、その制御機構を解析した。結果、CE-TOFMSとLC-TOFMSを組み合わせたメタボロミクスにより、主に酸化ストレス応答や浸透圧ストレス関連の分子の変動がみられ、それらを合成・分解する経路の多くが乾眠時にリン酸化されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Limno-terrestrial tardigrades can withstand extreme environments and almost complete desiccation through a mechanism called anhydrobiosis, but the its molecular mechanism is yet to be explored. To this end, we have conducted a comprehensive multi-omics analysis using the tardigrade *Ramazzottius varieornatus*, which is a potential model species for anhydrobiosis. In order to analyze the metabolic changes in the active and dehydrated states, we measured the metabolome in both conditions using two types of high-throughput mass spectrometry (MS) systems, CE-TOFMS and LC-TOFMS. Moreover, phospho-proteome was also analyzed to observed the metabolic regulations. As a result, while changes in gene expression profiles are limited in between active and tun states, dynamic changes were observed in the metabolism of this species in response to desiccation. Changes in the metabolic profiles suggests complex intracellular responses to oxidative and osmotic stress.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：メタボローム システム生物学 プロテオーム 乾眠 クマムシ クリプトピオシス マルチオミクス
バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

現存する全ての生物は生命活動のために「水」が必須であるが、緩歩動物門を形成する体長 0.1-1mm 程度の小動物であるクマムシの多くは乾眠という機構によって体内の水分を数%まで低下させて一切の生命活動を示さない無代謝状態に入ることができ、給水によってまた速やかに生命活動を再開できる。乾眠状態のクマムシは高温・低温・真空・高圧・化学物質・放射線などの極限環境へ耐性を持つことが知られ、2008 年にはさらに宇宙空間への暴露からの生存もが報告されているが、その分子機構は未だ不明な点が多い。

乾眠に移行するためにはある程度ゆっくりと乾燥する必要があり、この間に細胞内では乾燥耐性の準備をしていると考えられるため、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。これまでアルテミアやネムリユスリカなどの乾燥耐性動物で乾眠時にトレハロースが大量に蓄積することから、この糖が乾眠に重要な役割を果たすと推定されてきたが、これらの生物は特定の発生過程のみで乾燥耐性を持ち、また乾眠への移行も比較的長時間を要する。一方、より速やかにさまざまな発生段階で乾燥耐性を持つクマムシを始めとする生物ではトレハロースは蓄積せず乾燥耐性に重要ではないという報告が相次いでおり、これら生物の急速な乾燥耐性には未知の機構が存在すると考えられるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、クマムシ乾眠前後におけるメタボローム及びプロテオーム解析による網羅的な細胞内代謝物質及びタンパクの定量測定により、大きな変動を示す鍵分子を探索すると同時に、マルチオミクスデータをパスウェイのコンテキストで解析することでその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

本研究ではクマムシの中でも特に強い極限環境耐性を持ち、本邦で飼育系及び1つの卵に由来する純系統が確立されたヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) を対象とするが、この種は乾眠への移行及び復帰が 30 分以内と極めて早く、このような短時間では遺伝子発現による細胞内変化が困難であると考えられるため、この分子機構には遺伝子発現ではなく代謝物質が中心的な役割を担っていることが推定され、網羅的に代謝物質を測定するメタボロームのアプローチが有効であると考えられた。

一方で、このような代謝物質の変化を担う酵素は遺伝子発現を伴わない何らかの制御を短時間に受けている可能性があり、このために質量分析によるプロテオーム解析で通常/乾眠時のタンパク質のリン酸化状態の変化を定量的かつ網羅的に調べることで、乾眠機構がどのようなパスウェイによって構

成されているかを明らかにすることができると考えた。乾眠は複数の遺伝子が関わる複雑な分子機構であることが予想され、これを細胞システムの動態として明らかにするためにはこのように複数の網羅的な手法を組み合わせたマルチオミクスのアプローチが不可欠である。

3. 研究の方法

基本的なストラテジーとしては、通常と乾眠それぞれの状態のクマムシのメタボロームプロファイルを比較し、有意に増加ないし減少した代謝物質の同定を行った。網羅的に代謝物質を測定するために、イオン性化合物にキャピラリー電気泳動質量分析器 (CE-TOFMS) を、糖や脂質などの中性物質に高速液体クロマトグラフ質量分析器 (LC-TOFMS) を用いた。

質量分析を行うにあたっては効率的な細胞破碎及び代謝物質精製、そしておよその物質量の推定による、計測時のサンプル希釈倍率の設定に調整を行い、一回にメタボローム解析に必要な乾燥重量にして 10mg の代謝物質抽出するために必要な匹数 (約 2 万匹) と、効率的な細胞破碎法 (湿度 90% で数時間をかけて低密度で乾燥、0.5mm ジルコニアビーズによる破碎) を得ることができた。これを元に N=3 で通常と乾眠分、合計 6 サンプル (約 12 万匹) のクマムシを飼育、洗浄し、サンプル調整後、メタボロームを定量測定した。腸管内の餌がサンプルに混入するのを避けるため、24 時間の絶食後、ボアサイズ 30µm のメンブレン上で減圧しながら大量の精製水で体表を洗浄した。乾眠状態のサンプルは、予定通り復帰可能な乾眠状態に移行できたかを確認するために、同時に 100 匹ほどを別途乾燥させておき、給水により生命活動を再開できるかを検証した。N=3 サンプル間のサンプル量は Qubit によって 5% 程度の細胞抽出液から DNA 量を測定し、測定されたメタボロームの分布を元に統計的に補正した。加えて、同様の乾眠条件のサンプルについてリン酸化ペプチド濃縮法である HAMMOC 法を用いた LC-MS/MS によるリン酸化部位の網羅的な検出を行った。

4. 研究成果

我々はイオン性化合物と中性物質を網羅的に解析するために、CE 及び LC システムによる化合物の分離と、精密質量数を得るために飛行時間型 (Time-of-flight: TOF) MS を組み合わせた CE-TOFMS 及び LC-TOFMS によってヨコヅナクマムシの代謝変化を調べた。その結果、8 種の糖、合計 373 種の脂質、269 種の同定されたイオン性化合物、そして 1328 種の未知ピークを得た (図 1)。

クマムシは一般的に糖によるガラス化を行わないが、ヨコヅナクマムシにおいてもトレハロースが糖種の中では比較的多く存在しており、また、乾眠によって大幅な増加が

Metabolome fold change in tun

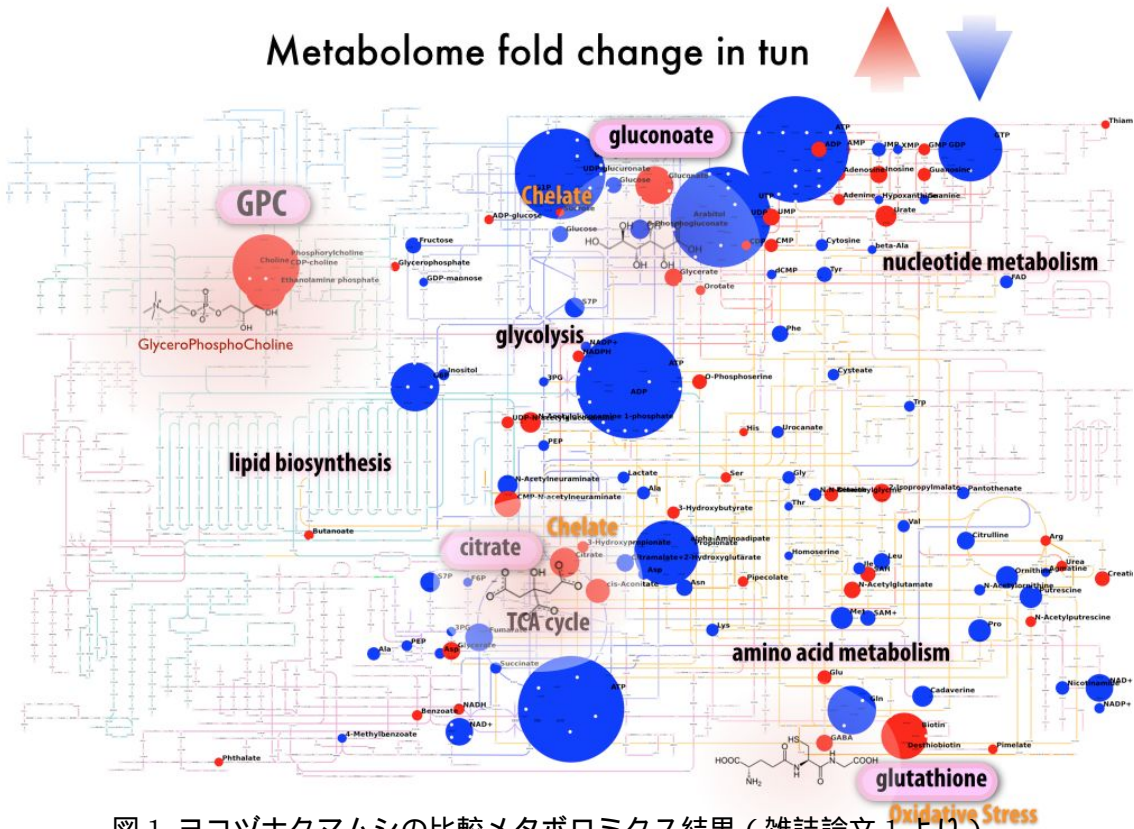


図1 ヨコヅナクマムシの比較メタボロミクス結果 (雑誌論文1より)

見られることを確認した。一方で、増加後の量はこれまでに多くのクマムシで報告されてきたように乾燥重量の1%にも満たない量であり、今回 CE-TOFMS による極めて精密なメタボローム解析を行った事で初めてこのような微量ながら顕著な変動を明らかにすることができたと思われる。この濃度では細胞をガラス化して保護するために十分であるとは考えにくく、実際には浸透圧ストレスにおいてトレハロースを部分的に活用していると思われる。

い増加を見せている。量的には GPC 程の蓄積がないが、変化量では通常時と乾眠時の代謝物質量に有意な増加 (Welch t-test, $p < 0.05$) を見せた 17 種の化合物のうち上位 4 種をコリン代謝系の中間化合物 (Phosphorylcholine, GPC, Ethanolamine phosphate, Choline, それぞれ約 3~8 倍変動) が占めていた。アニオンでは乾眠時に有意に増加した物質 22 種中 7 種を異なる長さの脂肪酸が占めており、脂質が全体的に減少していることから、脂質を分解して得られたグリセロールを使用して GPC を短時間で合成している非常にダイナミックな乾眠応答が起きていると考えられる。GPC は常に浸透圧ストレスにさらされる腎臓などで主要な働きをすることが知られている酸化ストレスや浸透圧ストレスにおいて重要な分子であり、タンパク質の保護や、水分子のように正電荷と負電荷を同一分子中に持つベタインとして細胞質中の遊離金属イオンを緩衝する働きが報告されている。

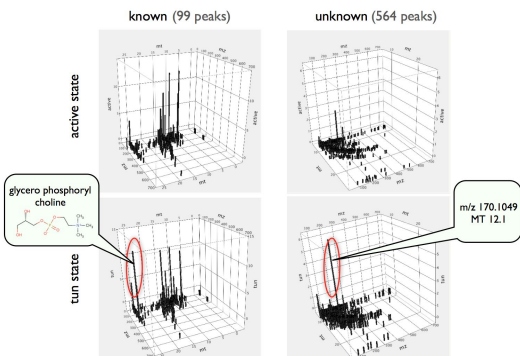


図2. カチオンのメタボローム変化 (雑誌論文1より)

糖以外では、最も顕著な物質の変化はカチオンに見られた (図2)。通常時と乾眠時のメタボロームプロファイルと比較すると、大多数の代謝物質には極端な変動は見られないものの、Glycerophosphocholine (GPC) が著し

さらに、ヨコヅナクマムシの乾眠では他にもさまざまな乾燥ストレス応答が起きていることがうかがえる。GPC の他にも酸化ストレス応答で代表的な酸化型グルタチオンやピオチンも大きく増加している他、有意な増加を示す化合物の多くはベタインかキレート作用を持つ分子であった。乾眠によって代謝が一旦停止するため、エネルギー源である ATP などの核酸やアミノ酸のほとんどは急激に使い尽くされ減少する。それに呼応し、GPC やグルタチオン、ピオチンなどといった酸

化・浸透圧ストレス対応のパスウェイが亢進し、中間代謝物質はそれぞれのパスウェイで最も近傍のキレートやベタインへと代謝・合成され、蓄積される。

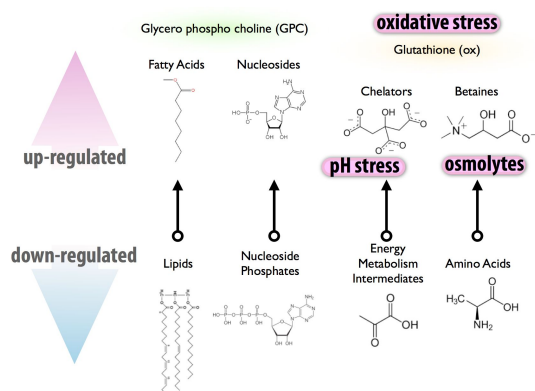


図 3. ヨコヅナクマムシ乾眠における代謝変化の概要 (雑誌論文 1 より)

即ち、できうる限り短時間で、残されたエネルギーを有効活用しながら全代謝系で乾燥による浸透圧・イオン・酸化のストレスに対応している様子が見えてきた。(図 3) これらメタボローム解析によって有意に変動を示すとされた分子は、パスウェイマップ上で直接接続する合成・及び分解を担う酵素が高確率で乾眠時にリン酸化されていることもリン酸化プロテオームの結果によってもサポートされた。

また、このようなマルチオミクス解析には、異なる内在ノイズを持つ大規模データを同一解析で活用するための新しい統計手法 (雑誌論文 2) や、パスウェイマップ上にメタボロームやプロテオームなどの異なるレイヤーのデータを解析して可視化する手法 (雑誌論文 6,7,8) が不可欠なため、そのためのバイオインフォマティクス基盤を開発・公開したことも本研究の重要な成果であると考えられる。

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 8 件)

1. Kazuharu Arakawa, Comparative metabolomics of anhydrobiosis in tardigrade *Ramazzottius varieornatus*, *Journal of Japanese Society for Extremophiles*, 査読無, Vol.11, 2013, 75-82.
2. Kazuharu Arakawa, Masaru Tomita, Merging Multiple Omics Datasets In Silico: Statistical Analyses and Data Interpretation, *Methods Mol. Biol.*, 査読無, Vol.985, 2013, 459-470.
3. Hidetoshi Itaya, Kazuki Oshita, Kazuharu Arakawa, Masaru Tomita, GEMBASSY: an EMOSS Associated

Software Package for Comprehensive Genome Analyses, *Source Code for Biology and Medicine*, 査読有, Vol.8, 2013, 17.

4. Daiki D. Horikawa, John Cumbers, Iori Sakakibara, Dana Rogoff, Stefan Leuko, Raechel Harnoto, Kazuharu Arakawa, Toshiaki Katayama, Takekazu Kunieda, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Lynn J. Rothschild, Analysis of DNA Repair and Protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after Exposure to UVC Radiation, *PLoS One*, 査読有, Vol.8, 2013, e6479.
5. Ayami Yamaguchi, Sae Tanaka, Shiho Yamaguchi, Hirokazu Kuwahara, Chizuko Takamura, Shinobu Ohmi, Daiki D. Horikawa, Atsushi Toyoda, Toshiaki Katayama, Kazuharu Arakawa, Asao Fujiyama, Takeo Kubo, Takekazu Kunieda, Two families of novel abundant heat-soluble proteins in an anhydrobiotic tardigrade, *PLoS One*, 査読有, Vol.7, 2012, e44209.
6. Yoshihiro Toya, Nobuaki Kono, Kazuharu Arakawa, Masaru Tomita, Metabolic flux analysis and visualization, *Journal of Proteome Research*, 査読有, Vol.10, 2011, 3313-3323.
7. Kazuki Oshita, Kazuharu Arakawa, Masaru Tomita, KBWS: an EMOSS associated package for accessing bioinformatics web services, *Source Code for Biology and Medicine*, 査読有, Vol.6, 2011, 8.
8. Kazuharu Arakawa, Nobuhiro Kido, Kazuki Oshita, Masaru Tomita, G-language Genome Analysis Environment with REST and SOAP Web Service Interfaces, *Nucleic Acids Research*, 査読有, Vol.48, 2010, W700-W705.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 荒川和晴, クマムシにおける乾眠の長さの違いはどこから生まれるのか, 生命情報科学若手の会 第五回研究会, 口頭, 2014 年 2 月 17 日, 千葉.
2. 荒川和晴, 生命活動はどのように始まり、そしてどのように止まるか - クマムシ乾眠機構からのアプローチ, 定量生物学の会 第六回年会, 口頭, 2013 年 11 月 24 日, 大阪.
3. Kazuharu Arakawa, Molecular mechanisms of cryptobiosis in tardigrade *Ramazzottius varieornatus* - the third state between life and death, 7th AYRCOB, 口頭, 2013 年 9

- 月 10 日, 東京.
4. Kazuharu Arakawa, Ito T, Kunieda T, Horikawa D, Soga T, Tomita M, Multi-Omics Study of Tardigrade *Ramazzottius Varieornatus* Reveals Dynamic Metabolic Response During Anhydrobiosis, Plant & Animal Genome Asia 2013, 口頭, 2013 年 3 月 18 日, Singapore.
 5. 荒川和晴, ヨコヅナクマムシはどのようにして生と死のはざまを生きるか, 生命情報科学若手の会 第四回研究会, 口頭, 2013 年 3 月 1 日, 岡崎.
 6. 荒川和晴, 生命活動はどのように始まり、そしてどのように止まるか - ヨコヅナクマムシ乾眠機構からのアプローチ, 定量オミックスワークショップ, 口頭, 2013 年 1 月 22 日, 大阪.
 7. Kazuharu Arakawa, Ito T, Kunieda T, Horikawa D, Soga T, Tomita M, Metabolomics of tardigrade *Ramazzottius varieornatus* reveals dynamic metabolic response during anhydrobiosis, 第 35 回日本分子生物学会年会, 口頭, 2012 年 12 月 13 日, 福岡.
 8. Kazuharu Arakawa, Ito T, Kunieda T, Horikawa D, Soga T, Tomita M, Metabolomics of tardigrade *Ramazzottius varieornatus* reveals dynamic metabolic response during anhydrobiosis, JST-BBSRC Workshop on Systems Redox Regulation, 口頭, 2012 年 10 月 25 日, 鶴岡.
 9. 荒川和晴, 生命活動とは何か - 生命と非生命の境界線を探る, 4 会合同シンポジウム「これからの生命科学を考える」, 口頭, 2012 年 10 月 16 日, 東京.
 10. Kazuharu Arakawa, Multi-omics study of the molecular mechanisms of extreme-tolerance in tardigrade *Ramazzottius varieornatus*, 日本微生物生態学会, 口頭, 2012 年 9 月 20 日, 豊橋.
 11. Kazuharu Arakawa, Ito T, Kunieda T, Horikawa D, Soga T, Tomita M, Metabolomics of tardigrade *Ramazzottius varieornatus* reveals dynamic metabolic response during anhydrobiosis, 12th International Symposium on Tardigrada, 口頭, 2012 年 6 月 25 日, Portugal.
 12. 荒川和晴, ヨコヅナクマムシ乾眠機構のメタボローム解析, 極限環境生物学会, 口頭, 2012 年 6 月 23 日, 東京.
 13. Kazuharu Arakawa, Ito T, Kunieda T, Horikawa D, Soga T, Tomita M, Metabolomics of tardigrade *Ramazzottius varieornatus* reveals dynamic metabolic response during

anhydrobiosis, 第 34 回日本分子生物学会年会, 口頭, 2011 年 12 月 14 日, 横浜.

14. 荒川和晴, ヨコヅナクマムシのマルチオミクス解析, 生命情報科学若手の会 第 3 回研究会, 口頭, 2011 年 10 月 16 日, 岡崎.
15. 荒川和晴, ヨコヅナクマムシのマルチオミクス解析, 生命情報科学若手の会 沖縄セミナー, 口頭, 2011 年 9 月 3 日, 沖縄.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
<http://web.sfc.keio.ac.jp/~gaou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 和晴 (ARAKAWA, Kazuharu)
慶應義塾大学大学院・政策・メディア研究科・特任講師
研究者番号 : 4 0 4 5 3 5 5 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :