

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19302

研究課題名（和文）新規に開発したクマムシ遺伝子発現ベクターを用いた、乾燥耐性の分子基盤解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism of anhydrobiosis using a newly developed gene expression vector system of tardigrade

研究代表者

田中 冴（Tanaka, Sae）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（機構直轄研究施設）・生命創成探究センター・特任助教

研究者番号：60770336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：乾燥耐性をもつクマムシという微小動物は、乾燥時に体内の水分量を3%以下まで低下させた無水生命状態（乾眠）に入る。この状態では、酸素消費やタンパク質合成などの代謝は一時的に停止しているが、給水後15分ほどで元の状態に戻ることができる。これまで、クマムシの乾眠機構の解明に向け、ゲノムやプロテオームなどのオミクス解析をおこない、いくつかの乾眠候補遺伝子を同定してきた。次の段階として、本研究では、クマムシ独自の遺伝子発現システムを新規に開発することで、クマムシ個体内で任意の遺伝子の強制発現を可能とし、世界で初めてのクマムシのライブイメージングに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クマムシの乾眠能力は、生体の完全な乾燥保存の良いモデルであるだけでなく、生き物のなかの自由な水分子が存在しない状態として「生命に水は必須である」という生物学的な常識に切り込むことができるという点でも非常に興味深い。本研究で開発したクマムシへの外来遺伝子導入手法は、クマムシの細胞内において脱水・給水の過程でどのような現象が生じているのかをライブで観察することを可能にした。本研究成果は、SNSや国内の新聞で複数取り上げられたほか、イメージングの賞 NIKON JOICO AWARD 2023を受賞した。

研究成果の概要（英文）：Tardigrades, microscopic animals, can tolerate desiccation by entering a dehydrated state (anhydrobiosis) in which the amount of water in their bodies is reduced to less than 3%. In this state, metabolism such as oxygen consumption and protein synthesis is temporarily suspended, but can resume within about 15 minutes after water is added. To date, we have performed omics analysis of the genome, transcriptome, and proteome to elucidate the anhydrobiotic mechanism of tardigrades, and have identified several candidate genes unique to tardigrades. In this research, we have developed a new gene expression system of tardigrades, which makes it possible to express any gene in an individual tardigrade, and successfully performed the world's first live imaging of tardigrades.

研究分野：極限環境生物学

キーワード：乾燥耐性 クマムシ ライブイメージング 外来遺伝子発現

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾燥耐性をもつクマムシという微小動物は、周辺環境が乾燥すると、体内の水分量を3%以下まで低下させた無水生命状態に入る。この無水状態では、タンパク質合成などの代謝は一時的に停止するが、給水後約15分で元の状態に戻ることができる。つまり、クマムシの乾燥耐性は、生体の乾燥保存の良い手本であるだけでなく、「生命に水は必須である」という生物学的な常識に反した、生体中の自由な水分子がない不可思議な状態であるといえる。

これまでのクマムシの研究は、非モデル生物でも実行可能な実験手法を用いて遂行されてきた。ゲノム配列の決定に始まり、トランスクリプトーム・プロテオームなどの解析により、乾燥耐性に関わる候補分子を同定してきた[Hashimoto, ..., Tanaka *et al.*, *Nat. Commun.*, 2016, Tanaka *et al.*, *PLOS ONE*, 2015, Tanaka *et al.*, *in preparation*]。また、同定した乾燥耐性候補遺伝子の機能を解析する目的で、ヒト培養細胞への強制発現系を用いたが、高浸透圧ストレスに対してであってもその耐性付与効果は限定的であった。クマムシ由来のタンパク質の性質を *in vitro* で検証する実験や、タンパク質の構造解析もおこなってきたが[Yagi, ..., Tanaka *et al.*, *Sci. Rep.*, 2021, Yoshida, ..., Tanaka *et al.*, *BMC Genomics*, 2021]、クマムシを直接的に解析する手法はほとんどなかった。

研究代表者はこの現状を打破すべく、クマムシ個体において直接的に乾燥耐性を調べる実験手法を構築することを考えた。Cas9 タンパク質を用いた遺伝子編集や RNA 干渉の実験を試みる過程で、タンパク質や核酸などをクマムシに導入する方法をまず探索した。その結果、顕微注入やエレクトロポレーションなどの有効性が確認した。次に、トランスクリプトームのデータから発現量の高い遺伝子を選び、クマムシ個体内で発現するプロモーターをもつ DNA ベクターの作出を試みた。その結果、クマムシのホームキープ遺伝子および乾燥耐性候補遺伝子それぞれのプロモーターを含む DNA プラスミドを導入したクマムシ個体において GFP 発現が確認できた。本ベクターにより、クマムシの細胞内で遺伝子を強制発現させ、クマムシ個体を用いて直接的に乾燥耐性を解析する実験が可能になった。

2. 研究の目的

これまで、クマムシの乾燥耐性機構の解明に向け、ゲノムやプロテオームなどのオミクス解析をおこない、いくつかの候補分子を同定してきた。これら候補分子の機能を調べる目的で、ヒト培養細胞に候補遺伝子を強制発現させ高浸透圧耐性の向上を調べたが、その効果は限定的であった。そこで研究代表者は、クマムシ内で遺伝子発現するベクターシステムを新規に開発することで、これまでヒト培養細胞や *in vitro* 系で間接的にしか検証できなかったクマムシの乾燥耐性機構を、より直接的に探索・解析できる実験基盤を構築した。本研究では、新規のクマムシ遺伝子発現ベクターを用いた候補遺伝子の強制発現により、クマムシ個体内での候補タンパク質の細胞内挙動や乾燥耐性への寄与を調べる。また同様に、既存のインジケータータンパク質を導入することで、これまで未知であった無水状態への移行期・活動状態への復帰段階における細胞内環境変化を観察する。これにより、乾燥耐性においてクマムシ個体内で実際に起きている現象を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究ではクマムシベクターを利用し、(1)耐性候補タンパク質の細胞内局在とその挙動変化の解析、(2)インジケータータンパク質の導入による、乾燥誘導時の細胞内環境変化の解析をおこなった。また、さらなるプロモーターの探索やベクター構造の改良を試みることで、生殖細胞への導入やトランスジェニッククマムシの作出、ノックアウト個体の作出などもあわせて検討した。

(1) 耐性候補タンパク質の細胞内局在とその挙動変化の解析

クマムシの耐性候補タンパク質は、乾燥処理により発現誘導されてくるクマムシ固有の遺伝子群に由来する。乾燥耐性に関わるタンパク質の一部は、近年、液-液相分離を起こすことが報告され、研究代表者もクマムシのタンパク質が乾燥とともに相分離を起こすことを *in vitro* で確認している。また、矢木らとの共同研究では、クマムシのタンパク質が濃度依存的にゲルを形成すること、培養細胞内では浸透圧刺激により可逆的な凝集を形成することを明らかにした [Yagi, ..., Tanaka *et al.*, *Sci. Rep.*, 2021]。この耐性候補タンパク質は、水分子の代わりとして他の生体分子と緩く相互作用することで、無水環境での変性や凝集を防ぐ役割をもつのではないかと考えられている。しかし、このような現象がクマムシ個体内で実際に生じるのかはまったく不明である。そこで、本研究では、耐性候補遺伝子をクマムシ個体の細胞に強制発現させることで、実際に無水生命状態への移行期などに相分離や凝集形成が生じるかを観察した。

(2) インジケータータンパク質の導入による、乾燥誘導時の細胞内環境変化の解析

無水生命状態においては、通常の細胞では起こりえない環境変化が生じていると考えられる。近年、活性酸素種を抑制する機構が乾燥耐性に関与する可能性が示唆されているが、脱水時にクマムシの細胞内・個体内のイオン濃度がどのように変動しているのかは未知である。このような細胞環境の変動を理解することは、無水生命状態の根本を理解することであり、ヒトなどの非耐性種における生体の乾燥保存法の確立に向けた重要な知見となる。本研究では、活性酸素種やイオン、pH に対するインジケータータンパク質をクマムシ個体内に導入することで、無水生命状態への移行・復帰における細胞環境の変動観察を試みた。

4. 研究成果

本研究で新規に開発したクマムシベクターは TardiVec (Tardigrade Vector) と名付けた。TardiVec はクマムシゲノムにおける高発現遺伝子上流下流各 1 kbp を DNA プラスミドに組み込み、その間に GFP 遺伝子配列をレポーター遺伝子として組み込むことで構成されている。この TardiVec を高濃度の DNA 溶液としてクマムシ個体に直接マイクロインジェクション(ガラス針による顕微注入法)により導入し、さらにエレクトロポレーション(電気穿孔法)により細胞内に取り込ませることで転写の場まで導入する(図 1)。TardiVec 導入後 24 時間から GFP 蛍光を観察

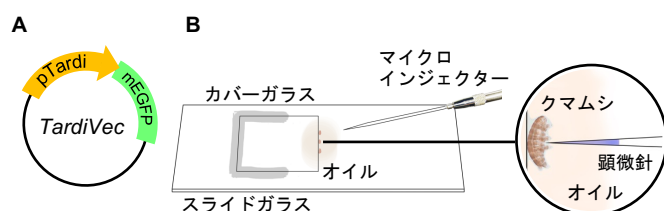
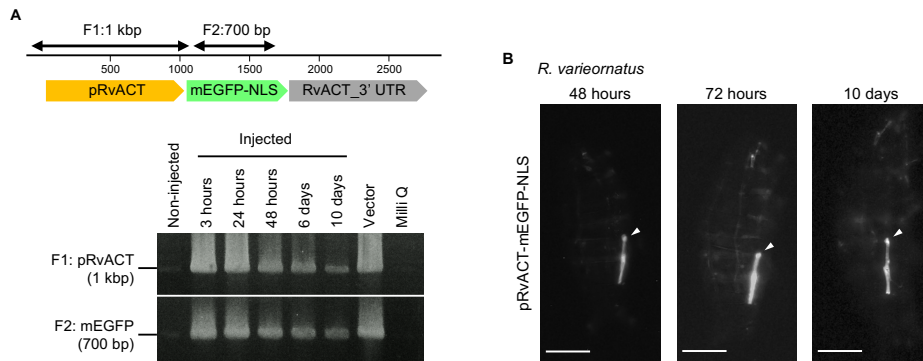


図 1. クマムシベクターTardiVec の構造とクマムシへのマイクロインジェクション

することができる。クマムシ由来の複数の高発現遺伝子をもとに TardiVec を作成し、GFP 蛍光を観察したところ TardiVec の特徴が明らかになってきた[Tanaka *et al.*, *PNAS*, 2023]。(1) TardiVec 導入後 10 日以上の間、DNA プラスミドも GFP も維持される(図 2)。同一個体を 10 日間観察したところ、同じ細胞で GFP 由来の蛍光が観察され続けた。また、TardiVec 導入後の個体から DNA を抽出し、PCR により外来 DNA 配列である GFP 遺伝子が検出されるかを確認したところ、10 日目の個体群からも GFP 遺伝子が検出された。このことから、クマムシの細胞には外来の DNA プラスミドを積極的に排除する機構が存在しない可能性が考えられる。



クマムシ内に存在する TardiVec を検出 筋肉に GFP を発現するクマムシを経時観察

図 2. TardiVec を導入したクマムシにおける DNA プラスミドと GFP 蛍光の維持

(2) 複数のクマムシ種に適応可能である。ゲノム配列が決定している 2 種のクマムシ、ヨコヅナクマムシ *Ramazzottius varieornatus* とヤマクマムシ *Hypsibius exemplaris* について、複数の TardiVec を作成し、配列由来種内での機能を確認した。その後、種間においても機能が維持されるのかを確認したところ、配列相同性が 50% 程度であるにも関わらず、異種由来のプロモーターが機能することが確認された。さらに、ゲノムが決定していない野外種であるオニクマムシ *Milnesium inceptum* や乾燥耐性能力のないゲスイクマムシ *Thulinus ruffoi* に対しても導入を試みたところ、導入効率はやや減少するものの、GFP 蛍光を確認することができたことから、TardiVec は異種のクマムシであっても機能することが明らかになった(図 3)。

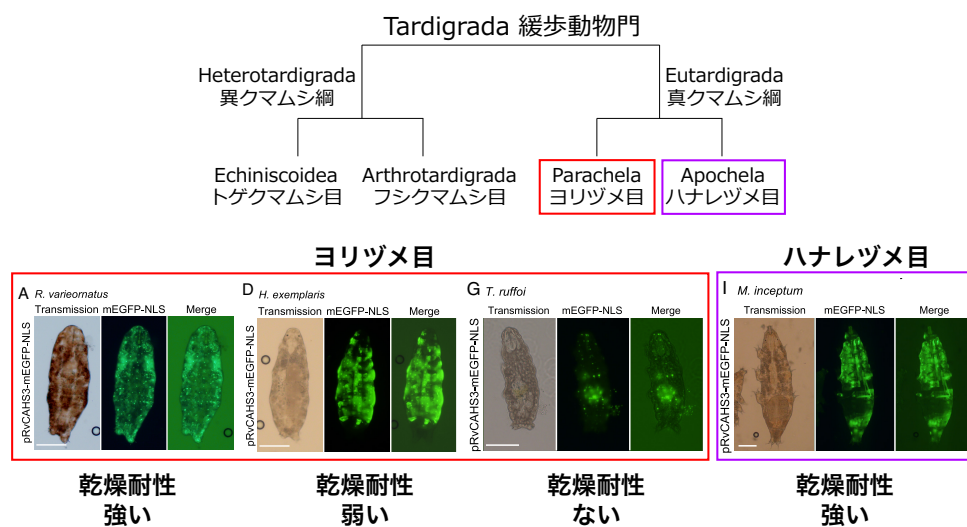


図 3. TardiVec をさまざまなクマムシ種に導入、観察した

(3) TardiVec は組織特異的な発現パターンを有す。複数の TardiVec の作成と導入から、元となった遺伝子とよく似た発現パターンを示すことが明らかになった。クマムシにおける耐性候補遺伝子について TardiVec を作成し導入・観察したところ、遺伝子によって発現組織が異なる様

子が観察された。これまで、クマムシの耐性候補遺伝子は全ての細胞が同じ遺伝子を用いて耐性機構を構築していると考えられてきたが、今回の結果から、組織ごとに使用する耐性遺伝子が異なる可能性が示唆された。(4) 乾眠後でも細胞内の蛍光タンパク質の観察が可能である。これまでほぼ完全に乾燥する個体における蛍光ライブイメージングは例がなかったが、今回 TardiVec によりそれに成功した。乾燥による細胞の収縮と水がなくなることで屈折率などが大きく変化することから、乾燥状態の観察は比較的困難であることも判明した。その一方で、乾燥後の再水和個体においても GFP の蛍光が観察されたことから、細胞中の GFP は乾燥によって完全には機能を失わないことが明らかになった。タンパク質により脱水による変性の度合いが異なる可能性は考えられていたが、今回実際に観察することで、GFP などを用いたライブイメージングが乾眠動物の解析において有効であることが明らかになった。さらに、カルシウムインジケータである GCaMP を発現させることでクマムシの筋肉細胞内のカルシウム変動を観察することに成功し、クマムシ細胞内でも汎用的なカルシウムインジケータが機能することがわかった。また、乾眠の前後において GCaMP 由来の蛍光を観察したところ、乾燥に伴う蛍光変化は観察されず、細胞内のカルシウム濃度が脱水により上昇しないように維持するような機構が存在する可能性が示唆された。以上の結果は 2023 年に PNAS 誌に報告し、同誌の In this Issue に取り上げられた他、国内のメディアでも複数報じられた。また、NIKON JOICO AWARD 2023 優秀賞というイメージングに関する賞も受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Sae, Arakawa Kazuharu	4. 巻 120
2. 論文標題 Reply to Tanaka and Kunieda: Control protein GFP also shows a mesh-like structure in desiccating tardigrade cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2316451120	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Sae, Aoki Kazuhiro, Arakawa Kazuharu	4. 巻 120
2. 論文標題 In vivo expression vector derived from anhydrobiotic tardigrade genome enables live imaging in Eutardigrada	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2216739120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuki, Tanaka Sae	4. 巻 13
2. 論文標題 Deciphering the Biological Enigma-Genomic Evolution Underlying Anhydrobiosis in the Phylum Tardigrada and the Chironomid Polypedium vanderplanki	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 557 ~ 557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/insects13060557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田中 湊
2. 発表標題 クマムシから解き明かすクリプトビオシスの分子機構
3. 学会等名 第一回多細胞休止を研究する会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tanaka Sae & Arakawa Kazuharu
2. 発表標題 Life-without-water Shining tardigrades illuminate the way to exploring the mechanism of dehydrated ametabolic state
3. 学会等名 第61回生物物理学会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tanaka Sae & Arakawa Kazuharu
2. 発表標題 Transition to life-without-water in anhydrobiotic tardigrades
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium 2023(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 乾燥耐性生物クマムシのミトコンドリア局在性熱可溶性タンパク質MAHS・LEAMにおける解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 クマムシミトコンドリアにおける乾燥耐性機構の解析
3. 学会等名 極限環境適応2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 クマムシの遺伝子発現ベクターTardiVecとGFPの細胞内取り込み
3. 学会等名 第8回クマムシ学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tanaka Sae, Arakawa Kazuharu
2. 発表標題 in vivo gene expression in tardigrades, a technical breakthrough coming to tardigrades
3. 学会等名 15th International Symposium on Tardigrada (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 光るクマムシで読み解く無水生命機構の謎
3. 学会等名 極限環境適応2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中冴
2. 発表標題 クマムシの無水生命状態と非構造タンパク質
3. 学会等名 第7回タタバイオ分子クラブ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka Sae, Arakawa Kazuharu
2. 発表標題 Transition to life-without-water in anhydrobiotic tardigrades
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 乾燥耐性動物クマムシにおける遺伝子発現系の確立と耐性関連タンパク質のダイナミクス観察
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 乾燥耐性生物クマムシのミトコンドリア局在性熱可溶性タンパク質MAHS・LEAMにおける乾燥誘導性LLPS
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 遺伝子発現系を用いた乾燥耐性動物クマムシにおけるバイオイメージング手法の確立
3. 学会等名 第31回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 クマムシにおける外来遺伝子発現系の確立
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 クマムシにおけるin vivo発現系
3. 学会等名 第7回クマムシ学研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関