

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657069

研究課題名(和文) 極限環境耐性動物クマムシで大量発現する新規タンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel proteins abundantly expressed in extremotolerant tardigrades.

研究代表者

國枝 武和 (KUNIEDA, Takekazu)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10463879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：陸生クマムシは乾燥に応じて脱水し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。耐性に関わる候補として大量に発現するクマムシ固有の遺伝子に着目して解析した結果、最大発現を示すA1遺伝子産物が螺旋状の構造体を形成することを明らかにし、機械的強度の付与を介して乾燥耐性に寄与することが考えられた。また、耐性能力の異なるクマムシ種から熱可溶性タンパク質を探索し新たなクマムシ固有タンパク質を同定するとともに、熱可溶性タンパク質量と耐性能力との間に相関関係があることを見出した。さらにミトコンドリアの保護に関わる候補としてミトコンドリアに局在する新規なクマムシ固有タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：Limno-terrestrial tardigrades can tolerate severe desiccation by entering an ametabolic dehydrated state called anhydrobiosis. Here, we focused and analyzed properties of novel proteins abundantly expressed in anhydrobiotic tardigrades as candidates involved in anhydrobiosis. A1 is the most abundantly expressed transcript and its protein products turned out to form an aggregated complex in a spiral shape. This aggregated structure could provide physical support to desiccating cells. We also identified a novel heat-soluble protein from less tolerant tardigrade species and showed the amount of heat-soluble proteins can correlate with tolerant ability of the species. Furthermore, as a candidate involved in protection of mitochondria against desiccation, novel mitochondrial proteins were identified.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：緩歩動物 乾燥耐性 熱可溶性 クマムシ

## 1. 研究開始当初の背景

一部の陸生クマムシは外界の乾燥に応じ、ほぼ完全に脱水し様々な極限環境に耐性を示すが、その分子メカニズムはほとんどわかっていない。近年行われたトランスクリプトーム解析の結果、ヨコヅナクマムシでは、クマムシ固有の新規遺伝子群が大量に発現していることも明らかとなり、これらの遺伝子産物群がクマムシ固有の耐性メカニズムに寄与している可能性が考えられた。実際、加熱しても沈殿しないクマムシ固有のタンパク質ファミリーである CAHS, SAHS タンパク質も大量に発現しており、乾燥時のタンパク質の変性・凝集の抑制への寄与が推定されている。しかし、CAHS, SAHS 以外のクマムシ固有の大量発現遺伝子については、その生化学的性状や機能を含めまったく解析されておらず、クマムシの乾燥耐性の分子メカニズムを明らかにするためには、こうした大量発現遺伝子の性状解析が急務と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、以下の3つの小課題を設定した。

(1) ヨコヅナクマムシ成体のトランスクリプトームデータにおいて最も発現量が高い遺伝子である A1 は、親水性アミノ酸を多く含むタンパク質をコードするにも関わらずその遺伝子産物は沈殿を形成することが分かっていた。A1 が何らかの高次構造体を形成して沈殿している可能性が考えられたことから、本小課題では、A1 の構造体形成の有無、および構造体の高次構造を明らかにし、これら構造体の乾燥耐性における役割の解明を目指す。

(2) 耐性能力の高いヨコヅナクマムシにおいてはクマムシ固有の新規熱可溶性タンパク質 CAHS, SAHS が大量発現していることが分かっていたが、耐性能力の弱い（もしくは無い）クマムシにおいて、こうした熱可溶性タンパク質の発現やその実体についてはまったく分かっていた。そこで、耐性能力の異なるクマムシを用いて熱可溶性タンパク質の同定および性状の解析を行い、これら熱可溶性タンパク質とクマムシの耐性能力の種差との相関関係の解明を目的とする。

(3) クマムシの細胞内には多数のオルガネラが存在しており、各オルガネラには固有の耐性遺伝子産物が局在している可能性が考えられた。そこで、オルガネラの代表としてミトコンドリアを選び、ミトコンドリアの耐性機構を担う候補タンパク質として、ミトコンドリアに局在する大量発現遺伝子の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) A1 に対する特異的な抗体を作成し、ヨ

コヅナクマムシ破碎液を遠心操作により分画し、A1 の挙動をウェスタンブロットにより解析した。また、高次構造体の形態観察については、大腸菌を用いて A1 のリコンビナントタンパク質を調製し、遠心操作によって粗精製後、透過型電子顕微鏡を用いてネガティブ染色像を観察した。また、A1 遺伝子を哺乳類培養細胞に transient に発現させ、乾燥処理・高塩処理後の生存率に与える影響を解析した。さらに、卵（胚）、幼体、成体と発生ステージの異なるヨコヅナクマムシを用いて、ウェスタンブロットにより A1 タンパク質の発現時期を解析した。

(2) 乾燥耐性の弱いクマムシ2種および耐性を持たないクマムシ1種について破碎液を調整し、加熱後に上清に残るタンパク質を探索した。1種の耐性の弱いクマムシについては EST データベースが利用可能であったことから、熱可溶性を示した主要なバンドについて nanoLC-MS/MS 解析を行い、構成タンパク質を同定した。同定したタンパク質について、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を調製し、その熱可溶性をヨコヅナクマムシの CAHS, SAHS タンパク質と比較した。さらに、クマムシの破碎液について、熱可溶性分画に回収されるタンパク質量を耐性の異なるクマムシ種間で定量的に比較した。

(3) ヨコヅナクマムシのトランスクリプトームデータを用いて、クマムシ固有の大量発現遺伝子のうち配列上ミトコンドリアへの局在が予測されるものを選別した。選別した遺伝子について、GFP 融合タンパク質の発現コンストラクトを作成し、哺乳類培養細胞に導入して、GFP の蛍光を指標に当該遺伝子産物の細胞内局在を解析した。

## 4. 研究成果

(1) まず最も発現量が多い A1 の遺伝子産物について、ヨコヅナクマムシの破碎液からの分離を試み、低速遠心の沈殿分画に A1 が最もメジャーなタンパク質として回収できることを見出した。この分画のネガティブ染色像を電子顕微鏡により観察した結果、直径約 15nm の螺旋状の構造体が観察された。さらに大腸菌発現系を用いて誘導・精製したリコンビナント A1 タンパク質について非変性条件でのネガティブ染色像を観察した結果、先のクマムシ破碎液の沈殿分画で観察されたものと同様の構造体が観察された。このことから、クマムシ破碎液で観察された構造体は A1 タンパク質によって構築されたものと考えられ、こうした構造体を形成することで、細胞に機械的な強度を付与し乾燥などに伴う力学的ストレスへの抵抗性強化に寄与している可能性が考えられた。次に、A1 タンパク質の機能する時期を明らかにするために、発生段階における Western blot 解析を行った結果、繁殖可能な成体および胚発生初期で強

く発現するが、胚発生後期から幼体でにかけて急激に減少することが明らかとなり、A1は特定の時期にのみ機能していると考えられた。

(2) 耐性能力の異なるクマムシ種を用いて熱可溶性タンパク質の探索を行った結果、耐性の弱い種においても熱可溶性タンパク質が存在することが見出された。これらの熱可溶性タンパク質の同定を試みた結果、新たなクマムシ固有の熱可溶性タンパク質を見出した。また、クマムシ破砕液における熱可溶性タンパク質の占める割合を解析した結果、各クマムシ種の乾燥耐性能力と呼応してその割合が変動することがわかった。このことから熱可溶性タンパク質の量とクマムシ個体の耐性能力との間に相関関係があることが示された。

(3) クマムシ成体のトランスクリプトームデータを元に発現量の高い遺伝子群を抽出した後、遺伝子配列をもとに複数の細胞内局在予測プログラムを用いてミトコンドリアに局在する可能性の高い遺伝子を選別した。こうして選別された遺伝子の多くは他種のミトコンドリアタンパク質と相同性を示し、ミトコンドリアでの機能が推定された一方、一部の遺伝子は他の動物には相同遺伝子は見出されず、クマムシで独自に進化したか、水平伝播によって獲得されたものと考えられた。トランスクリプトームデータから、こうした遺伝子がクマムシ個体内で発現しているのはほぼ間違いないと考えられたことから、次に実際にミトコンドリアに局在する性質を持つかを検証するために、GFP融合タンパク質として哺乳類培養細胞に発現させて、細胞内局在を解析した。その結果、GFPの蛍光は目的タンパク質との融合依存に、ミトコンドリアマーカと共局在することが分かった。以上の結果から、今回同定したタンパク質群の少なくとも一部はクマムシ体内でミトコンドリアに局在していると考えられた。

## 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 1 件)

- ① Yamaguchi A, Tanaka S, Yamaguchi S, Kuwahara H, Takamura C, Imajoh-Ohmi S, Horikawa D. D, 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、10.1371/journal.pone.0044209

[学会発表] (計 8 件)

- ① 田中冨、秦裕子、尾山大明、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシにおける新規ミトコンドリアタンパク質の同定、第36回日本分子生物学会、2013年12月4日、兵庫・神戸
- ② 田中冨、秦裕子、尾山大明、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシにおける新規ミトコンドリアタンパク質の同定、細胞を創る研究会6.0、2013年11月14-15日、山形・鶴岡
- ③ Tanaka S, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T, and Kunieda T. Identification of novel mitochondrial proteins from an anhydrobiotic tardigrade. *Dynamito* 2013, 2013年11月1日、Okinawa
- ④ 田中冨、秦裕子、尾山大明、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシにおける新規ミトコンドリアタンパク質の同定、第14回極限環境生物学会、2013年10月26-27日、神奈川・川崎
- ⑤ 山口理美、田中冨、山口志保、久保健雄、國枝武和、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回極限環境生物学会、2012年12月1日、日本大学・東京
- ⑥ 伊藤麻紀子、鈴木忠、近藤裕子、秦裕子、尾山大明、久保健雄、國枝武和、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回極限環境生物学会、2012年12月1日、日本大学・東京
- ⑦ Kunieda T, Arakawa K, Katayama T, Toyoda A, Kuwahara H, Horikawa DD, Suzuki Y, Abe K, Shin-I T, Ohishi K, Motoyama A, Aizu T, Kohara Y, Fujiyama A. Genome annotations and transcriptomic analysis in *Ramazzottius varieornatus*. 12th International Symposium on Tardigrada 2012年7月23-26日、ポルト (ポルトガル)
- ⑧ Tanaka S, Yamaguchi A, Yamaguchi S, Kuwahara H, Takamura C, Ohmi S, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. Two families of novel abundant heat-soluble proteins in an anhydrobiotic tardigrade. 12th International Symposium on Tardigrada 2012年7月23-26日、ポルト (ポルトガル)

[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〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/saibou/kuma/>

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

久保 健雄 (KUBO, Takeo)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10201469