

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660288

研究課題名(和文)ミトコンドリアをモデルとしたクマムシの極限環境耐性メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of tolerance using tardigrade mitochondria

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：陸生クマムシの一部は乾眠と呼ばれる脱水状態になって乾燥に耐えるが、その分子基盤には不明な点が多い。本研究では耐性の単純モデルとしてクマムシのミトコンドリアに着目し、ストレス耐性に関わる候補タンパク質として2種の熱可溶性タンパク質を初めて同定した。これらのタンパク質はヒト培養細胞の高浸透圧耐性を向上させることを示した。さらに、クマムシ個体から高純度のミトコンドリア分画を分離する方法を確立し、ショットガンプロテオミクスにより、クマムシのミトコンドリアに局在するタンパク質を網羅的に同定した。これらはミトコンドリアの保護に関わる良い候補と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Some terrestrial tardigrades exhibit extreme desiccation-tolerance by entering a dehydrated state called anhydrobiosis. Molecular basis of anhydrobiosis remains largely unknown. In this study, we focused on the mitochondria of tardigrades as a simple model to elucidate the molecular basis of desiccation tolerance. Here, we identified two novel heat soluble proteins, which localize in mitochondria and transfection of these genes enhanced the tolerance of human cultured cells against osmotic stresses. Furthermore, we isolated a high purity mitochondrial fraction from tardigrades and comprehensively identified mitochondrial proteins using a shotgun proteomic approach. These proteins are served as good candidates involved in desiccation tolerance of tardigrade mitochondria.

研究分野：極限生物学

キーワード：ミトコンドリア クマムシ 乾燥耐性 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

陸生クマムシの多くは周囲の乾燥に伴って、体内の自由水をほぼ失った「乾眠」と呼ばれる無代謝状態に移行し乾燥に耐える。乾眠状態のクマムシは高温、高圧、真空、放射線などの様々な物理化学的ストレスに耐性を示し、吸水により速やかに生命活動を再開する。乾眠メカニズムの解明は動物細胞の乾燥保存法の開発にもつながることから、学術的興味のみならず産業応用の観点からも注目されてきた。乾眠能力を持つ動物を対象としたこれまでの解析から、乾眠に関わる候補分子として糖やタンパク質がいくつか同定されてきたが、これらの分子群を用いても乾眠能力を他生物に賦与するには至っていない。このことは動物細胞の乾眠メカニズムが多く分子が絡む複雑なものであることを示唆しており、乾眠メカニズムの原理を理解するためには、より単純な系での解析から開始するのが適切と考えられた。

近年行われたゲノム解読の結果、クマムシのミトコンドリアゲノムはゲノムサイズも遺伝子レパートリーも他の動物種とほぼ同様であるのに対し、核ゲノムには多数のクマムシ固有の新規遺伝子がコードされており、その一部はミトコンドリアへの局在が予測されることが明らかになった。クマムシのミトコンドリアはクマムシ細胞の一部として乾燥や様々な極限環境に耐性を示すと考えられるが、この耐性はクマムシ核ゲノムにコードされた遺伝子産物がミトコンドリアに移入されて担うと考えられる。ミトコンドリアは動物細胞全体とは比較にならないほど構造が単純であることに加え、クマムシ細胞から移入される分子に着目することでミトコンドリアの耐性に関わる遺伝子群の全容把握が可能と考えられ、乾眠メカニズムの原理を解明する上で極めて優れたモデルであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、共生細菌に由来する半自立的なオルガネラであるミトコンドリアを、クマムシ細胞と同様の耐性をもつ単純な生体モデルとして捉え、耐性に関わる遺伝子産物の網羅的な同定と機能の解析、および同定した遺伝子群による他生物種への耐性賦与を試みる。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア大量発現遺伝子の予測

ヨコヅナクマムシのトランスクリプトームデータをもとに、成体期に大量に発現する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子群のアミノ酸配列から、複数のプログラムを用いて細胞内局在を予測し、ミトコンドリア局在が予測される大量発現遺伝子群を同定した。

(2) 細胞内局在解析

前項目で抽出した遺伝子群について GFP 融

合タンパク質として個別にヒト培養細胞に強制発現し、細胞内局在を解析した。ミトコンドリア染色試薬 Mito-Tracker との対比により、ミトコンドリアに局在する性質を持つタンパク質を選別した (図 1)。

(3) 熱可溶性アッセイ

大腸菌発現系を利用して目的タンパク質を大量に調製した。付加したヒスチジンタグを利用して Ni-NTA 樹脂を用いて目的タンパク質をアフィニティ精製した。菌破碎液および精製タンパク質を加熱したのち遠心し熱可溶性分画を得た。SDS-PAGE により加熱前サンプルと比較し、目的タンパク質の熱可溶性を評価した。

(4) 高浸透圧耐性アッセイ

pEB ベクターを利用して、目的タンパク質を恒常的に発現するヒト培養細胞株を樹立した。当該細胞株を様々な濃度のスクロースを含む高浸透圧培地に曝露した後、等張培地に置換し細胞生存率を測定した。

(5) 細胞内分画

クマムシ個体の破碎液から細胞内分画法を用いてミトコンドリア分画を抽出した。ミトコンドリア、細胞質、小胞体の各マーカータンパク質に対する Western blot 法により、各分画の純度を評価した。

(6) ショットガンプロテオミクス

ミトコンドリア分画および全身破碎液についてタンデム質量分析を行った。得られた質量データをゲノム解読により別途構築した全タンパク質モデルと照合し、各サンプルに含まれるタンパク質群を網羅的に同定した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア局在新規熱可溶性タンパク質の同定

ヨコヅナクマムシのトランスクリプトームデータにおいて大量に発現する遺伝子から、ミトコンドリアに局在し、かつ加熱しても沈殿しない (熱可溶性) タンパク質 2 種を同定した (図 1)。1 種 (RvLEAM) は LEA (Late Embryogenesis Abundant) タンパク質と相同性を示したが、もう一種はクマムシ類に固有の遺伝子であり、MAHS (Mitochondrial Abundant Heat Soluble protein) と名付けた。これまでに細胞質および細胞外に局在するクマムシ固有の熱可溶性タンパク質 CAHS と SAHS を同定しており、MAHS の発見によってクマムシの細胞には各細胞内コンパートメントに固有の熱可溶性タンパク質が存在することを明らかにした。

(2) 熱可溶性タンパク質によるヒト培養細胞の高浸透圧耐性の向上

RvLEAM および MAHS を個別にヒト培養細

胞に導入し、それぞれを定常的に発現する株を作出した。これらの定常発現株について比較的穏和な水欠乏ストレスである高浸透圧曝露への耐性を計測した結果、いずれの遺伝子の定常発現株も親株に比べて高浸透圧曝露後の生存率が向上していることが明らかになった。今回同定した2種の遺伝子はいずれもクマムシのミトコンドリアにおいて乾燥耐性に寄与していると考えられた。

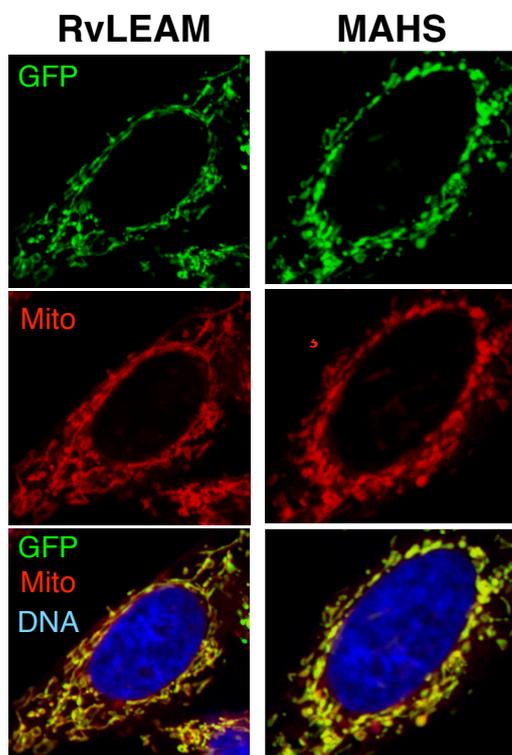


図1. 新たに同定した2種の熱可溶性タンパク質RvLEAMとMAHSのミトコンドリア局在

(3) ショットガンプロテオミクスによるミトコンドリアタンパク質の網羅的同定

クマムシミトコンドリアの耐性関連タンパク質を網羅的に同定するために、クマムシからミトコンドリア分画を単離し、質量分析を用いたショットガンプロテオミクス解析を実施した。単離したミトコンドリア分画は分画マーカーを用いたウェスタンブロットにおいて細胞質や小胞体の混入は認められず純度の高い分画が得られた。比較対象としてクマムシ全身の破碎液についても同様の解析を行い、両サンプルから合わせて約2000種類のタンパク質が検出された。ペプチドカウントをもとにミトコンドリア分画に濃縮されているタンパク質として約800種を同定した。このうちの約10%の遺伝子はクマムシに固有の新規遺伝子であり、耐性に関わる良い候補と考えられた。

同定したタンパク質群のうち、他の後生動物に相同遺伝子が見出されないタンパク質は、クマムシに特徴的な耐性能力に関わる良い候補と考えられたことから、これらのタンパク質群のうち発現量の高いものから優先

的に GFP 融合タンパク質としてヒト培養細胞に発現し、ミトコンドリアに局在する性質を持つタンパク質群を選別した。選別した遺伝子群を個別にヒト培養細胞に遺伝子導入して安定発現細胞株を作出した結果、これまでに少なくとも2種のタンパク質において高浸透圧耐性が向上することを明らかにした。

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3件)

- ① Kondo K, Kubo T, Kunieda T. Suggested Involvement of PP1/PP2A Activity and De Novo Gene Expression in Anhydrobiotic Survival in Tardigrade, *Hypsibius dujardini*, by Chemical Genetic Approach. *PLOS ONE*, 査読あり, **10**, 2015, e0144803. DOI: 10.1371/journal.pone.0144803
- ② Tanaka S, Tanaka J, Miwa Y, Horikawa DD, Katayama T, Arakawa K, Toyoda A, Kubo T, Kunieda T. Novel Mitochondria-Targeted Heat-Soluble Proteins Identified in the Anhydrobiotic Tardigrade Improve Osmotic Tolerance of Human Cells. *PLOS ONE*, 査読あり, **10**, 2015, e0118272. DOI: 10.1371/journal.pone.0118272
- ③ 田中 冨, 國枝 武和, 顕微鏡の中の小さなクマ: クマムシの乾燥耐性、サイエンスネット、査読なし、**53**、2015、10-13. <https://www.chart.co.jp/subject/rika/scnet/53/Snet53-3.pdf>

[学会発表] (計12件)

- ① 國枝 武和、クマムシの極限環境耐性メカニズム-正しいクマムシゲノムの読み解き方、広島大学生命科学セミナー(招待講演)、2016年2月18日、広島大学(広島県東広島市)
- ② Kunieda T, Ito M, Kondo K, Minakuchi Y, Noguchi H, Tanaka S, Hashimoto T, Katayama T, Arakawa K, Toyoda A, Kubo T, Fujiyama A. Comparative omic analysis between anhydrobiotic tardigrade and desiccation-sensitive tardigrade. 2015年6月23日、Modena (Italy).
- ③ Kondo K, Kubo T, Kunieda T. Chemical genetic analysis of regulatory mechanism of anhydrobiosis in tardigrades. 2015年6月23日、Modena (Italy).
- ④ Hashimoto T, Saito Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Enomoto A, Miyagawa K, Kuwahara H, Horikawa DD, Katayama T, Arakawa K, Toyoda A, Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. A novel chromatin protein of radiation-resistant animal protects DNA and cells from radiation damages. 2015年6月23日、Modena (Italy).

- ⑤ 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 乾燥耐性クマムシにおけるミトコンドリア局在タンパク質の同定と解析、第15回極限環境生物学会、2014年11月3日、今帰仁村コミュニティーセンター（沖縄県今帰仁村）
- ⑥ 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 クマムシにおけるミトコンドリアの乾燥耐性機構の分子基盤解析、第3回マトリョーシカ型生物学研究会若手招待講演（招待講演）、2014年7月11日、神戸大学百年記念館（兵庫県神戸市）

〔図書〕（計1件）

- ① 國枝 武和 他、コロナ社、極限環境生命-生命の起源を考え、その多様性に学ぶ、2014、220

〔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