

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281016

研究課題名(和文) 極限環境耐性動物クマムシの持つ高い放射線耐性を支える分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of radiation tolerance 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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：クマムシは高い放射線耐性を持つ動物として知られるが、その耐性を可能にする分子基盤はまったく分かっていなかった。本研究課題では、クマムシのクロマチン分画から同定された新規タンパク質Dsupに着目し、同タンパク質がC末端側領域を介してDNAに直接結合し、動物細胞の核DNA全体と共局在することを示した。さらに、Dsupを導入したヒト培養細胞では、X線照射によるDNA傷害の発生が約半分に抑制され、放射線耐性が向上することを明らかにした。本研究は、クマムシの放射線耐性に寄与するタンパク質を同定した初めての例であるとともに、クマムシの耐性が他生物に移転可能であることを明示した成果である。

研究成果の概要(英文)：Tardigrades, also known as water bears, are small aquatic animals living in various habitats. They enter an almost completely dehydrated state upon desiccation and exhibit exceptional tolerance against various physical extremes, including direct exposure to space. Here, we identified a novel tardigrade-unique protein named 'Dsup' (short for damage suppressor) from a chromatin fraction of a radiation-tolerant tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*. Dsup protein forms a complex with DNA in vitro and is co-localized with nuclear DNA in cells. We engineered human cultured cells to stably express Dsup constitutively, and demonstrated that Dsup-expressing cells exhibited a substantially suppressed occurrence of DNA-breaks after X-ray irradiation and exposure to ROS. Furthermore, survival after X-ray irradiation was significantly improved in Dsup-expressing cells, some of which even retain proliferative ability, though untransfected cells completely cease proliferation.

研究分野：極限生物学

キーワード：放射線耐性 クマムシ 緩歩動物 DNA損傷 DNA保護 Dsup

1. 研究開始当初の背景

高線量の放射線への曝露は多くの生物にとって致死的であるが、いくつかの生物種はこうした放射線に高い耐性を持つ。なかでもクマムシは高い放射線耐性を持つ動物として知られる。クマムシは体長 400 ミクロン程度の微小動物で、外環境が乾燥すると、体内の水を失い乾眠と呼ばれる無代謝状態になって乾燥に耐える。乾眠状態のクマムシは多様な環境に耐性を示し、特に放射線に対しては乾燥の有無によらずヒトの半致死量の約 1,000 倍(4,000 Gy)の照射に耐える。こうした高い放射線耐性能力を支える分子メカニズムについてはまったく未解明のままであった。本研究で使用しているヨコヅナクマムシは高い放射線耐性を持ち、我々のグループが中心となってゲノム解読も完了していることから、動物のもつ高い放射線耐性の分子メカニズムを解析するうえで優れた材料と考えられた。研究開始時までに、放射線耐性に関わる分子候補として、ヨコヅナクマムシのクロマチン分画から新規タンパク質 **Dsup** (開始当初の名称は **S261**)を同定していた。**Dsup** をヒト培養細胞に導入すると、核 DNA 全体とほぼ同じ局在を示した。クマムシ固有のタンパク質であることと、ゲノム DNA の広い領域と共局在していることから、**Dsup** は高線量の放射線照射による DNA 障害の抑制・修復促進に寄与する良い候補タンパク質と考えられたが、実験的な証拠はなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、クマムシの高い放射線耐性の分子メカニズムの解明を目的として主にヨコヅナクマムシのクロマチンから同定した固有の新規タンパク質 **Dsup** に着目して解析を進める。DNA への結合能など生化学的性状を明らかにするとともに、放射線障害からの保護・修復機構への寄与の解析を進めることで、多細胞動物における新規な DNA の保護・修復機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) DNA 結合能の解析

Dsup リコンビナントタンパク質を大腸菌のコールドショック発現系を用いて合成し、His タグに対するアフィニティを用いて精製した。線形プラスミド DNA をプローブとしてゲルシフト法を用いて精製 **Dsup** タンパク質との結合能を解析した。また、結合に関わる領域を解析するために、さまざまな領域を欠失した **Dsup** タンパク質を調製し、同様に DNA 結合能を解析した。

(2) **Dsup** タンパク質の免疫組織化学

精製リコンビナント **Dsup** タンパク質を抗原として、抗 **Dsup** 抗血清を調製し、アフィニティ精製により特異性の高い抗体を調製した。クマムシ胚の凍結切片に対して免疫組織化学染色を行い、クマ

ムシにおける **Dsup** タンパク質の局在パターンを解析した。

(3) **Dsup** 発現ヒト培養細胞の樹立

強力な構成的プロモーターである CAG プロモーターの下流に **Dsup** 遺伝子を組み込んだコンストラクトをヒト胎児腎由来培養細胞 HEK293 細胞に導入し、薬剤耐性を指標に安定発現株を樹立した。**Dsup** タンパク質の発現はウェスタンブロット及び免疫細胞化学により検出、核内局在を確認した。

(4) **Dsup** による DNA 保護活性の検出

Dsup 発現ヒト培養細胞に 5-10 Gy の X 線を照射した後、中性条件およびアルカリ条件それぞれにおいて comet assay を行い、DNA の断片化の程度を定量的に解析した。また、1 Gy の X 線を照射した後、DNA 2 本鎖切断のマーカーである γ H2AX に対する免疫細胞化学解析を行って foci 数を計数し、2 本鎖切断数を定量した。コントロール細胞として、**Dsup** を導入していない HEK293 のほか、**Dsup** 発現細胞に **Dsup** を標的とした short hairpin RNA 発現コンストラクトを導入し、**Dsup** の発現を選択的に抑制したノックダウン細胞を樹立し、比較した。ノックダウン細胞における発現低下は定量的 RT-PCR により検証した。

(5) **Dsup** によるヒト培養細胞の放射線耐性の向上の検証

Dsup 発現培養細胞に 4 Gy の X 線を照射した後、12 日後まで継続培養し、細胞のバイアビリティ、生存細胞数を計数した。また、8-12 日後において細胞形態を位相差顕微鏡像として観察・撮影した。比較対象として **Dsup** 非導入細胞と **Dsup** ノックダウン細胞を用いた。

4. 研究成果

- (1) **Dsup** タンパク質は高い塩基性を示すことから、DNA に直接結合する可能性が考えられた。大腸菌を用いて調製したリコンビナントタンパク質を DNA に加えることで、DNA の電気泳動における移動度が顕著に低下し、**Dsup** タンパク質が DNA に直接結合する能力を持つことが示唆された。また、その移動度の変化が著しいことから、**Dsup** タンパク質は DNA と巨大な複合体を形成すると考えられた。**Dsup** タンパク質の配列を詳細に解析すると、C 末端側において塩基性アミノ酸の割合が高いことが分かり、この領域が静電的に DNA の結合に寄与していることが考えられた。そこで、C 末端側を含め、**Dsup** タンパク質の様々な領域を欠失した変異タンパク質を作成し、同様の方法で DNA 結合活性を測定した結果、C 末端側領域が DNA との結合に必要な十分であることが示された。**Dsup** タンパク質の C 末端側領域は細胞内におけ

る核 DNA との共局在にも必要十分であることが分かり、細胞内で Dsup は自身の DNA 結合能を介して DNA 近傍に局在することが示唆された。

- (2) Dsup の核 DNA との共局在は、哺乳類および昆虫培養細胞において観察されていたが、クマムシの細胞における局在は分かっていた。そこで、Dsup に対する特異的な抗体を作成し、クマムシ胚から作成した切片に対して免疫組織化学染色を行った。その結果、Dsup は胚の多くの細胞で発現し、発現細胞においては核 DNA と共局在していることがわかった。
- (3) Dsup の放射線耐性への影響を調べるために、Dsup を定期的に発現するヒト培養細胞を作出した。作出過程で巨大化するなど異常な形態を示す細胞群も観察されたが、形態が正常で増殖する細胞クローンを複数培養維持できた。そのうち、Dsup タンパク質の発現量が比較的高いクローン群について免疫細胞化学染色を行い、核 DNA と共局在し最も大量に発現している細胞ラインを確立し、以降の解析に用いた。
- (4) Dsup 発現細胞に X 線を照射した後、DNA の断片化をコメットアッセイ法を用いて定量した。2 本鎖切断のみを検出する中性条件と 1 本鎖切断をあわせて検出するアルカリ条件両方について検証した結果、いずれの条件においても Dsup 発現細胞はコントロールの非発現細胞に比べて、DNA の断片化が約 40-50% 程度抑制されていることがわかった。また、別の解析手法として DNA 切断マーカーである γ H2AX を検出する実験系を用いた場合にも、やはり Dsup 発現細胞では DNA 切断数が約半分に抑制されていることがわかった。コメットアッセイの実験系において、X 線照射を氷上で行った後ただちにコメットアッセイの電気泳動に供していることから、顕著な修復が起きる前に DNA の断片化が少なくなっていたと考えられた。また、 γ H2AX は修復完了後もしばらく残存することを合わせて考えると、Dsup による DNA 傷害の減少は、DNA 修復過程の促進というよりも DNA 傷害の発生自体が抑制されていると考えられた。これまで、多くの放射線耐性生物では、DNA 修復機構が耐性の重要な役割を担うと考えられてきたことから、本発見は高い放射線耐性を実現する分子機構として新たな視点を提供することになった。
- (5) Dsup は放射線による DNA 傷害を低減したことから、細胞の放射線耐性が向上している可能性が考えられた。ヒト培養細胞 HEK293 の増殖能を完全に奪う線量である 4 Gy の X 線を照射した後、12 日後まで細胞数の計数と形態の観察を行っ

たところ、Dsup 非発現細胞や Dsup ノックダウン細胞は増殖能を喪失し 8-10 日後以降は顕著に細胞数が減少したのに対し、Dsup 発現細胞では、一部の細胞が生存し、非照射群と同等の増殖能を示すことがわかった。形態的にも Dsup 非発現細胞や Dsup ノックダウン細胞は丸く浮き上がった死細胞様の形態のみが観察されたのに対し、Dsup 発現細胞では培養皿に接着した生細胞様の形態が一部観察され、その数が経時的に増加することが観察された。以上の結果は、Dsup はヒト培養細胞の放射線耐性を向上させたことを示している。

本研究課題では、クマムシ固有のタンパク質である Dsup が放射線耐性の向上に寄与することを初めて明確に示し、クマムシの持つ耐性能力の一部が遺伝子の転移によって他生物の細胞に付与できることを示した。Dsup はクマムシの放射線耐性に寄与する分子として同定された初めての例であり、クマムシ固有のタンパク質が耐性能力の分子基盤になるという新しい視点を提供した。クマムシ個体の示す放射線耐性は 4000Gy であり、今回の Dsup 単体による耐性向上が見られた線量となお 1000 倍の開きがある。解読されたクマムシのゲノム中には多数のクマムシ固有遺伝子が同定されており、これらはクマムシの耐性を担う有力な候補と考えられる。本研究成果は、耐性向上を担う遺伝子を同定するとともに、今後の耐性遺伝子の解析指針を示した点で、当該分野に大きく貢献するものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① Hashimoto T, Horikawa DD and Kunieda T (2017) Novel protein in tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*, improves radio-tolerance of human cultured cells. *Rad Biol Res Comm*, **52**(1), 1-13 (査読有り)
- ② Hashimoto T, Horikawa DD, Saito Y, Kuwahara H, Kozuka-Hata H, Shin-I T, Minakuchi Y, Ohishi K, Motoyama A, Aizu T, Enomoto A, Kondo K, Tanaka S, Hara Y, Koshikawa S, Sagara H, Miura T, Yokobori S, Miyagawa K, Suzuki Y, Kubo T, Oyama M, Kohara Y, Fujiyama A, Arakawa K, Katayama T, Toyoda A and Kunieda T (2016) Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Comm* **7**, 12808. doi: 10.1038/ncomms12808. (査読有り)
- ③ Ito M, Saigo T, Abe W, Kubo T and Kunieda T (2016) Establishment of an

isogenic strain of the desiccation-sensitive tardigrade *Isohypsius myrops* (Parachela, Eutardigrada) and its life history traits. *Zool J Linn Soc* **178**(4), 863-870. doi: 10.1111/zoj.12449. (査読有り)

- ④ Kondo K, Kubo T and Kunieda T (2015) Suggested Involvement of PP1/PP2A Activity and De Novo Gene Expression in Anhydrobiotic Survival in a Tardigrade, *Hypsibius dujardini*, by Chemical Genetic Approach. *PLoS ONE* **10**(12), e0144803. doi: 10.1371/journal.pone.0118272. (査読有り)

[学会発表] (計 27 件)

- ① Kunieda T. Novel tardigrade protein protects DNA from radiation and ROS in human cultured cells. International Symposium on LIVING IN SPACE 2017, 2017 年 3 月 9 日、一ツ橋ホール (東京都・千代田区)
- ② 橋本拓磨、斎藤裕樹、秦裕子、榎本敦、堀川大樹、荒川和晴、片山俊明、豊田敦、尾山大明、宮川清、久保健雄、國枝武和、放射線耐性動物クマムシの新規タンパク質によるヒト培養細胞における DNA 傷害の抑制と放射線耐性の向上、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016 年 10 月 28 日、JMS アステールプラザ (広島県・広島)
- ③ Kunieda T, Hashimoto T, Horikawa DD, Kuwahara H, Kondo K, Tanaka S, Saigo T, Kubo T, Fujiyama A, Arakawa K, Katayama T, Toyoda A, Correct Decoding of Genomic Strategy in Extremotolerant Tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*. 11th International Congress on Extremophiles, 2016 年 9 月 12 日~16 日、京都大学 (京都府・京都)
- ④ 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、榎本敦、宮川清、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和。極限環境耐性動物クマムシの新規クロマチンタンパク質による哺乳類培養細胞への放射線耐性の付与、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015 年 6 月 30 日~7 月 2 日、タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ⑤ Hashimoto T, Saito Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Enomoto A, Miyagawa K, Kuwahara H, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. A novel chromatin protein of radiation-resistant animal protects DNA and cells from radiation damages, 13th International

Symposium on Tardigrada, 2015 年 6 月 23 日~6 月 26 日、Modena (Italy)

- ⑥ Hashimoto T, Saito Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Enomoto A, Miyagawa K, Kuwahara H, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. A novel chromatin protein of radiation-resistant animal protects DNA and cells from radiation damages, 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 5 月 25 日~5 月 29 日、京都大学 (京都府・京都)
- ⑦ 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、榎本敦、宮川清、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、放射線耐性を示すクマムシの新規タンパク質 S261 による DNA 損傷の抑制、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜)
- ⑧ 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、榎本敦、宮川清、桑原宏和、堀川大樹、片山俊明、荒川和晴、豊田敦、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、放射線耐性を示すクマムシの新規タンパク質による DNA 損傷の抑制、極限環境生物学会第 15 回年会、2014 年 11 月 2 日、今帰仁村コミュニティセンター (沖縄県・名護)
- ⑨ 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、榎本敦、宮川清、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、放射線耐性を示すクマムシの新規タンパク質 S261 による DNA 損傷の抑制、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 2 日、かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島)
- ⑩ 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、榎本敦、宮川清、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、放射線耐性を示すクマムシの新規タンパク質による DNA 損傷の抑制、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 13 日、東北大学 (宮城県・仙台)
- ⑪ 國枝武和、クマムシの耐性の秘密を探る、第 37 回日本土壌動物学会大会、2014 年 5 月 24 日~5 月 24 日、駿河台大学 (埼玉県・飯能市)
- ⑫ 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、高い放射線耐性を示すヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~12 月 6 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸)
- ⑬ Hashimoto T, Saito Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Kuwahara H, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K,

Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. Proteomic analysis of chromatin fraction in an anhydrobiotic tardigrade, Ramazzottius varieornatus, 29th RBC-NIRS International Symposium, 2013 年 11 月 29 日～11 月 30 日、京都大学（京都府・京都）

- ⑭ 橋本拓磨、齋藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、高い放射線耐性を示すヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 の解析、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日～10 月 20 日、ホテルクラウンパレス（青森県・青森）
- ⑮ 橋本拓磨、齋藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 による DNA 断片化の抑制、極限環境生物学会第 14 回年会、2013 年 10 月 26 日～10 月 27 日、明治大学（神奈川県・川崎）
- ⑯ 橋本拓磨、齋藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、高い放射線耐性を示すクマムシの新規クロマチンタンパク質の解析、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 26 日～9 月 28 日、岡山大学（岡山県・岡山）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 伊藤政博 鳴海一成 佐藤孝子 中村聡 東端啓貴 國枝武和 為我井秀行 道久則之 伊藤隆、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

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：DNA 傷害抑制剤
発明者：國枝武和、橋本拓磨
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-032209 号
出願年月日：平成 27 年 2 月 20 日
国内外の別：国内

○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.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/kuma/>

プレスリリース（論文②について）

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/5001/>

論文②について、下記の国内外のメディアより報道された。

朝日新聞、毎日新聞、時事通信、産経新聞、日刊工業新聞、中日新聞、静岡新聞、西日本新聞、琉球新報、福井新聞、河北新報、千葉日報、北海道新聞、宮崎日日新聞、徳島新聞、山陰中央新報、四国新聞、上毛新聞、福島民報、佐賀新聞、共同通信、日経サイエンス、nature ダイジェスト、実験医学、ITmedia、マイナビニュース、NatureAsia、BBC News、Washington Post、New York Times、Wall Street Journal、C&EN、AFPBB、New Scientist、Popular Science、Science Daily、Scientific American、Discover、Seeker、Nature (News)、Science (News)、NatureAsia、Yahoo! News、International Business Times、Daily Mail、AstrobiologyWeb、Smithonian Magazine、20 Minuten、ABC、All News、Asian Scientist、Bangkok Post、Blick、Business Insider、China Post、Christian Science Monitor、Engadget、Extreme Tech、Fars News Agency、GEN、GenomeWeb、GIZmodo、Huffington Post、International Business Times、International World Report、Inverse、L' Express、Le Science、PBS、Phys.org、RochetNews、Science World Report、Seeker、Space Daily、Tech Times、The Verge、The World Seeds、Vice、Wired、World Economic Forum、ZAP、ZME Science など。

論文②で報告した新規 DNA 保護タンパク質 Dsup について UniProt の Protein Spotlight で取り上げられた。

http://web.expasy.org/spotlight/back_issues/188/

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

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()