

令和 2 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：2016～2018

課題番号：16H02951

研究課題名(和文) 高い放射線耐性を持つ動物クマムシの放射線防護メカニズムの解析

研究課題名(英文) Study on the novel radioprotection mechanisms in radiotolerant tardigrades

研究代表者

國枝 武和 (Kunieda, Takekazu)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

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)：本研究課題では高い放射線耐性を示すクマムシに固有なDNA防護タンパク質Dsupについて、そのDNA防護メカニズムの解明を行った。その結果、Dsupタンパク質が活性酸素種からDNAを防護する活性を持ち、放射線への抵抗性の少なくとも一部は間接作用の遮蔽によることを示唆した。さらに、そのメカニズムはDNA傷害の修復促進ではなくストレス因子からのDNA防護であることを明瞭に示すと同時に、それを可能にするDNAやクロマチンへの結合様式を持つことを示し、これまで知られていたものとはまったく異なる新たなDNA保護機構/放射線耐性機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は地球上の動物の中でも抜きん出て放射線耐性の高いクマムシについて、その独自の放射線耐性タンパク質Dsupの性状・機能を解析することで、これまで知られていなかった新たなDNA保護機構/放射線耐性機構を明らかにしたもので、放射線による生物影響の低減技術の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Dsup is the protein unique to radiotolerant tardigrades which suppress DNA damage and increase radiotolerance in human cultured cells. This study indicates that Dsup has an ability to protect DNA from reactive oxygen species (ROS) and thus the radioprotective ability of Dsup is suggested to be due to suppression of indirect effects of radiation. In vitro study clearly demonstrated that Dsup's radioprotective ability does not depend on the facilitation of DNA repair. The binding mode of Dsup to DNA molecule and the action of Dsup on reconstructed nucleosomes are well consistent with the DNA protection activity of Dsup. The study revealed novel DNA protection mechanism which may support high radiotolerance in tardigrades.

研究分野：極限生物学

キーワード：放射線 クマムシ DNA 活性酸素種

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 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極限環境に耐性を示し、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不明な点が多い。これまでに私達は高い放射線耐性を持つヨコヅナクマムシを材料に、核ゲノム全体と共局在するクマムシ固有の新規タンパク質 **Dsup** を同定し、同タンパク質がヒト培養細胞において X 線照射による DNA 障害を低減し、細胞の放射線耐性を向上させることを見出していた。高い放射線耐性を持つ生物についてはこれまで主に放射線耐性細菌について解析が進められており、その耐性能力は高い DNA 修復能に依存していることから、放射線によって生じた DNA 障害が速やかに修復されることが放射線耐性の主要なメカニズムであると考えられてきた。一方で、**Dsup** タンパク質を発現した細胞では放射線照射後の DNA 障害の発生量自体が抑制されていることを示唆するデータが得られており、**Dsup** の主要な役割は DNA 修復ではなく DNA 防護である可能性が考えられた。しかし、**Dsup** のような一介のタンパク質が放射線のような物理ストレスを遮蔽できるとは考えられず、その耐性への寄与メカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、動物の中で抜きん出て高い放射線耐性を示すクマムシを材料に、主に新規タンパク質である **Dsup** に着目し、放射線耐性の向上に寄与するメカニズムの解明を目的とする。特にこれまでの通説と一致しない DNA を防護する活性を示すかどうかを明瞭に検証するとともに、その防護メカニズムを明らかにすることで、多細胞動物における新規な放射線耐性機構の解明を目指す。

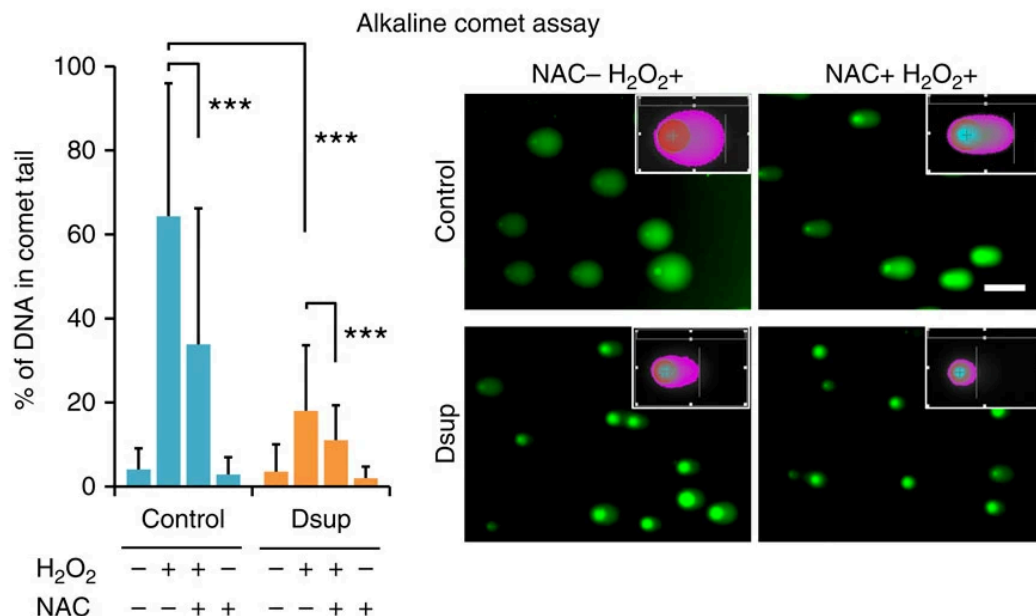
### 3. 研究の方法

- (1) **Dsup** 発現ヒト培養細胞における活性酸素種による DNA 障害に対する DNA 保護活性の検出  
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、薬剤耐性を指標に樹立した安定発現株を使用した。**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。**Dsup** 発現ヒト培養細胞を活性酸素種の一つである過酸化水素に曝露した後、アルカリ条件下においてコメットアッセイを行い、DNA の一本鎖切断の程度を定量的に解析した。また、比較対照として抗酸化剤である N アセチルシステイン (NAC) の共存下においても同様の解析を行い、DNA 障害の発生と抑制に与える影響を解析した。
- (2) *In vitro* における活性酸素種による DNA 障害に対する **Dsup** の DNA 保護活性の検出  
大腸菌を用いて合成したリコンビナント **Dsup** タンパク質を用いて、DNA 保護活性を *in vitro* で検証した。DNA 障害系として、フェントン反応によって発生させたラジカルによって *in vitro* で DNA を分解する系を用いた。*In vitro* の DNA 障害系に **Dsup** タンパク質を様々な濃度で添加し残存した DNA をゲル電気泳動によって検出することで DNA 分解に対する影響を解析した。比較対照として同程度の分子量で DNA 結合能を持たない BSA を用いた。
- (3) *In vitro* における X 線による DNA 障害に対する **Dsup** の DNA 保護活性の検出  
DNA 溶液に X 線を照射した後、残存した DNA をゲル電気泳動によって検出した。X 線照射時に様々な濃度のリコンビナント **Dsup** タンパク質を添加し、DNA 分解に対する影響を解析した。
- (4) 原子間力顕微鏡 (AFM) による **Dsup** の DNA・クロマチンへの結合様式の解析  
リコンビナント **Dsup** タンパク質と linear DNA を混合した後、AFM によりその形状を観察した。また、予めコアヒストンと DNA とを混合してヌクレオソーム構造を形成したクロマチン様複合体にリコンビナント **Dsup** タンパク質を混合し、AFM で観察することでクロマチン構造に与える **Dsup** の影響を解析した。さらに、**Dsup** について様々な領域を欠失した変異タンパク質を合成し、DNA/クロマチンとの結合様式を解析することで各領域の役割を明らかにした。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト培養細胞 HEK293 を 100  $\mu$ M の過酸化水素に 30 分曝露すると核 DNA に顕著な一本鎖切断が誘起され、アルカリコメットアッセイにおいて半分以上の DNA が分解領域であるテイル領域に検出された。これに対し **Dsup** 発現細胞ではテイル領域に検出された DNA 量は 1/3 と DNA 切断が顕著に抑制されたことが分かった。このことから、**Dsup** は酸化ストレスからも DNA を防護する活性を持つことが示された。過酸化水素処理は 4°C で行いその後ただちにアルカリ条件に浸漬していることからコメットアッセイの前に DNA 修復はほとんど起き

ていないと考えられ、Dsup は修復ではなく活性酸素種による DNA 障害の発生自体を抑制したことが示唆された。抗酸化剤である NAC は過酸化水素による DNA 傷害を抑制したが、Dsup 発現細胞ではその抑制作用が低減していた。このことは Dsup による DNA 防護作用が抗酸化作用とオーバーラップしたものであることを示唆している。Dsup のようなタンパク質が X 線のような放射線を直接遮蔽することは極めて考えにくい、活性酸素種のような化学物質に対しては物理的もしくは化学的な障壁として作用する可能性は考えやすい。X 線による DNA 切断は過半が間接作用と呼ばれる X 線が水分子と反応して発生した活性酸素種による傷害に依る。Dsup の DNA 防護の本態は活性酸素種からの防護であり、研究開始時に判明していた X 線からの DNA 防護能の一部は今回見いだされた活性酸素種からの防護によるものと考えられる。



- (2) 前項で Dsup は活性酸素種から DNA を防護することが示唆された。しかし細胞を用いる限り修復の促進による可能性を排除できなかった。そこで、フェントン反応を用いた *in vitro* での DNA 傷害系を用いて Dsup の影響を解析した結果、Dsup の添加量依存に DNA が防護されることが示された。*In vitro* では DNA 修復系が存在しないことを考えるとこの結果は Dsup の作用機序が修復の促進ではなく DNA の防護であることを明瞭に示している。
- (3) 放射線からの DNA 防護についても修復促進の可能性を否定するために DNA 溶液に X 線を照射する *in vitro* の系を用いて Dsup の影響を解析した結果、Dsup は *in vitro* でも DNA を X 線から防護する活性を示すことを明らかにした。
- (4) Dsup が単体で DNA を活性酸素種や X 線から防護できたことから、Dsup の DNA への結合様式を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した結果、Dsup は DNA 鎖に沿って被覆する鞘のように連続的に結合している様子が観察された。リコンビナント Dsup タンパク質は超遠心解析により通常は単量体で存在していたことから、DNA と結合することで他の Dsup タンパク質を呼び込み連続的な結合をもたらすものと考えられた。また、被覆するような結合様式は DNA を保護する活性と良く合致するものであった。さらに、動物細胞内では核 DNA は通常ヌクレオソーム構造を形成していることから、*in vitro* でヌクレオソーム構造を再構成したクロマチン様 DNA に Dsup を添加し AFM で観察した結果、Dsup の添加依存に複数のヌクレオソーム同士が結合し、クロマチンが凝集している様子が観察された。この凝集は DNA の被覆よりも低濃度の Dsup の添加で生じたことから細胞内で Dsup はヌクレオソームを形成した DNA により効率的に結合し、コンパクトの凝集を誘導しているものと推定される。こうした凝集も DNA とストレス因子との衝突を低減する効果を持つと考えられ、Dsup の DNA 防護機構の一端を担う活性と考えられた。

以上、本研究課題では放射線から DNA を守ることを明らかにしていたクマムシの Dsup タンパク質の本態が、活性酸素種からの DNA 防護であること、そのメカニズムは修復促進ではなくストレス因子からの防護であること、それを可能にする DNA やクロマチンへの結合様式を持つことを明らかにし、これまで知られていたものとはまったく異なる新たな DNA 保護機構/放射線耐性機構を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida Yuki, Koutsovoulos Georgios, Laetsch Dominik R., Stevens Lewis, Kumar Sujai, Horikawa Daiki D., Ishino Kyoko, Komine Shiori, Kunieda Takekazu, Tomita Masaru, Blaxter Mark, Arakawa Kazuharu	4. 巻 15
2. 論文標題 Comparative genomics of the tardigrades <i>Hypsibius dujardini</i> and <i>Ramazzottius varieornatus</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2002266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.2002266	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Takuma, Kunieda Takekazu	4. 巻 7
2. 論文標題 DNA Protection Protein, a Novel Mechanism of Radiation Tolerance: Lessons from Tardigrades	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 26 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life7020026	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 橋本拓磨、國枝武和	4. 巻 75
2. 論文標題 極限環境耐性を持つクマムシのゲノム戦略を読み解く	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 131-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋本拓磨、國枝武和	4. 巻 75
2. 論文標題 X線からヒト培養細胞を守るクマムシタンパク質Dsup	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 102-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋本拓磨、國枝武和	4. 巻 35
2. 論文標題 クマムシのゲノムから発見した新規タンパク質Dsupはヒト培養細胞の放射線耐性を向上させる	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 445-448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 國枝武和	4. 巻 96
2. 論文標題 最強とも呼ばれる可愛らしい動物・クマムシ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 92-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 7
2. 論文標題 Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 12808 ~ 12808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms12808	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 Ito Makiko, Saigo Tokiko, Abe Wataru, Kubo Takeo, Kunieda Takekazu	4. 巻 178
2. 論文標題 Establishment of an isogenic strain of the desiccation-sensitive tardigrade Isohypsibius myrops (Parachela, Eutardigrada) and its life history traits	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Zool J Linn Soc	6. 最初と最後の頁 863 ~ 870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/zoj.12449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Takuma, Horikawa Daiki D., Kunieda Takekazu	4. 巻 52
2. 論文標題 Novel protein in tardigrade, Ramazzottius varieornatus, improves radio-tolerance of human cultured cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Radiation Biology Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 國枝武和	4. 巻 69
2. 論文標題 クマムシ-極限環境耐性と静的生命の新しい研究モデル	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 596-602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋本拓磨、國枝武和	4. 巻 56
2. 論文標題 クマムシがもつ高い放射線耐性機構の謎を解く	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 520-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Kunieda T
2. 発表標題 Decoding the Molecular Strategy of Radiotolerance in Extremotolerant Animal Model, Tardigrades
3. 学会等名 END02018, the Endocrine Society 's 100th annual meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kunieda T
2. 発表標題 Decoding of unique strategy for extreme tolerance in tardigrades
3. 学会等名 Vienna Biocenter Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kunieda T
2. 発表標題 The rise of tardigrade-unique toolbox for extremotolerance
3. 学会等名 14th International Symposium on Tardigrada (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國枝武和、橋本拓磨、堀川大樹、近藤小雪、田中冴、柴原礼良、桑原宏和、秦裕子、尾山大明、榎本敦、宮川清、原雄一郎、横堀伸一、小原雄治、藤山秋佐夫、久保健雄、荒川和晴、片山俊明、豊田敦
2. 発表標題 ベールを脱ぎ始めたクマムシの極限環境耐性メカニズム
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 國枝武和
2. 発表標題 動物の極限環境耐性から生命の本質を探る
3. 学会等名 未来へのバイオ技術勉強会-超絶生物イノベーション (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴原礼良、日詰光治、橋本拓磨、荒木弘之、久保健雄、國枝武和
2. 発表標題 高い放射線耐性を持つクマムシに固有なDNA防護タンパク質DsupのDNA結合様式の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴原礼良、日詰光治、橋本拓磨、久保健雄、國枝武和
2. 発表標題 高い放射線耐性を持つクマムシに固有なDNA防護タンパク質DsupのDNA結合様式の解析
3. 学会等名 極限環境生物学会2017年度年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kunieda T
2. 発表標題 Novel tardigrade protein protects DNA from radiation and ROS in human cultured cells
3. 学会等名 International Symposium on LIVING IN SPACE 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 國枝武和
2. 発表標題 極限環境に耐える動物クマムシの秘密を探る
3. 学会等名 第72回日本寄生虫学会西日本支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本放射線影響学会第59回大会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 國枝武和、橋本拓磨、堀川大樹、桑原宏和、近藤小雪、田中冨、原雄一郎、横堀伸一、小原雄治、藤山秋佐夫、久保健雄、荒川和晴、片山俊明、豊田敦
2. 発表標題 極限環境に耐えるヨコヅナクマムシのゲノム戦略
3. 学会等名 第17回極限環境生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kunieda T, Hashimoto T, Horikawa DD, Kuwahara H, Kondo K, Tanaka S, Saigo T, Kubo T, Fujiyama A, Arakawa K, Katayama T, Toyoda A
2. 発表標題 Correct Decoding of Genomic Strategy in Extremotolerant Tardigrade, <i>Ramazzottius varieornatus</i>
3. 学会等名 11th International Congress on Extremophiles (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kondo K, Katou Y, Shirahige K, Kubo T, Kunieda T
2. 発表標題 Involvement of PP1/PP2A in Tolerance and the Initial Transcriptional Response to Desiccation in Anhydrobiotic Tardigrade, <i>Hypsibius dujardini</i>
3. 学会等名 11th International Congress on Extremophiles (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小島広樹、久保健雄、國枝武和
2. 発表標題 ヨコヅナクマムシ由来細胞の分離法の確立と耐性能力の解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第69回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kunieda T
2. 発表標題 Unique strategy for amazing resilience of tardigrades
3. 学会等名 Organs under stress symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kunieda T
2. 発表標題 The rise of tardigrade-unique toolbox for extremotolerance
3. 学会等名 14th International Symposium on Tardigrada (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saigo T, Ito M, Satoh K, Kubo T and Kunieda T
2. 発表標題 Tolerance to gamma radiation in the desiccation-sensitive tardigrade <i>Isohypsibius myrops</i> (Parachela, Eutardigrada)
3. 学会等名 14th International Symposium on Tardigrada (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shibahara R, Hizume K, Hashimoto T, Araki H, Kubo T and Knieda T
2. 発表標題 AFM analysis of DNA binding mode of a novel DNA-protection protein, Dsup, unique to a radiotolerant tardigrade
3. 学会等名 14th International Symposium on Tardigrada (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國枝 武和
2. 発表標題 最強動物！？クマムシのサバイバル戦略を読み解く
3. 学会等名 動物学会関東支部公開講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國枝 武和
2. 発表標題 極限環境に耐えるクマムシの耐性戦略に迫る
3. 学会等名 第一回再生学異分野融合研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國枝武和
2. 発表標題 極限環境に耐えるクマムシの耐性戦略を読み解く
3. 学会等名 第78回日本寄生虫学会東日本支部大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴原 礼良, 日詰 光治, 橋本 拓磨, 荒木 弘之, 國枝 武和
2. 発表標題 高い放射線耐性を持つクマムシに固有なDNA防護タンパク質DsupのDNA保護メカニズムの解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

くまむし研究グループ <a href="http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/kuma/">http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/kuma/</a> くまむし研究グループ <a href="http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/kuma/">http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/kuma/</a> ヒト培養細胞の放射線耐性を向上させる新規タンパク質をクマムシのゲノムから発見 <a href="https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/5001/">https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/5001/</a>
---

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