

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15781

研究課題名(和文) 乾燥耐性の分光学的評価方法の構築と、乾燥耐性再構成系からの耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Establishment of a spectroscopic evaluation method of anhydrobiosis in anhydrobionts and reconstruction system to elucidate anhydrobiosis mechanism

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(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生命に水は不可欠である。その一方で、ほぼ完全に脱水した状態で生命を維持できる生物種が存在する。この能力は乾燥耐性とよばれ、生体保存のよい手本であり、現在主流の凍結保存に取って代わる可能性が期待されている。本研究では、乾燥耐性をもつ微小生物クマムシにおける乾燥耐性の分子基盤の解明を目的としている。特に本研究では、脱水過程で生じる現象を定量化・可視化することに焦点を当てている。本研究では世界で初めて、外来遺伝子を導入したクマムシを作成する技術を構築し、GFPなどの蛍光タンパク質を用いてクマムシの細胞内で脱水過程にどのような現象が起きているのかを観察できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾燥耐性は水を完全に失った状態であるが、給水によって元に戻ることができる。このメカニズムの解明は、精子卵子、食物の保存において新たな方法を提供するばかりか、水が必須である生命システムにおける水分子の役割と生体分子との関わりを明らかにすることができる。本研究では、乾燥耐性生物の細胞内において脱水の行程でどのような現象が生じているかを観察する目的で、蛍光タンパク質を細胞内に発現させる実験方法を世界で初めて構築した。

研究成果の概要(英文)：Water is essential for life. On the other hand, there are species that can survive in an almost completely dehydrated state. This ability, referred to as anhydrobiosis, is a good example of biopreservation and is expected to replace the current mainstream cryopreservation. The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of anhydrobiosis in tardigrade. In particular, this research focuses on quantifying and visualizing the phenomena that occur during the dehydration process. In this research, I have established a technology to introduce exogenous genes to tardigrade, and observed what kind of phenomenon occurs in the cell of tardigrade using fluorescent proteins such as GFP.

研究分野：分子生物学

キーワード：乾燥耐性 クマムシ

1. 研究開始当初の背景

生命に水は不可欠である。生体分子の構造やその生化学反応のすべては水系環境を前提としており、脱水は、器官・組織・細胞・生体分子の各段階に不可逆的な障害をもたらす。その一方で、ほぼ完全に脱水した状態で生命を維持できる生物種が存在する。この能力は乾燥耐性 (Anhydrobiosis) とよばれ、クマムシをはじめ、いくつかの無脊椎動物や細菌類、菌類などで見つかっている。このような乾燥状態では、酸素消費などの細胞内の代謝は停止しており、生物時計も停止しているため、生体は完全な状態で保存されている。このことから、クマムシなどがもつ乾燥耐性状態は、生体保存の非常によい手本であると考えられ、現在主流の凍結保存に取って代わる可能性が期待されている。

乾燥耐性動物であるクマムシにおいては、ゲノム解読が完了し、オミクススペースの解析からクマムシ特異的なタンパク質が複数同定されるなど、近年研究が飛躍的に発展している [Yamaguchi, 2012, Tanaka, 2015, Hashimoto, 2016, Yoshida, 2017]。しかしながら、ヒトなどの非耐性種における乾燥耐性の再構成は、いまだに部分的にしか成功していない [Hand, 2007、Chakrabortee, 2007、Li, 2012、Marunde, 2013, Tanaka, 2015]。また、脱水や再水和の過程でどのような現象が生体内で生じうるのかも不明確であり、これまでに試行されてきた再構成がなぜ・どの段階で失敗に至っているのかさえ判断することが難しい状況である。このような問題を解決するには、乾燥耐性機構を有する生物種におけるライブイメージング手法の確立や、それらに比較的近縁な非耐性種に対して対象遺伝子を導入し、耐性を付与させるなどの実験が不可欠であると考えられるが、これまでにそのような手法は開発されていない。

本研究では、まず、クマムシの遺伝子発現系に介入するさまざまな手法の確立を試みることでこれらの問題にアプローチする。さらに主な問いである「脱水や再水和の過程でどのような現象が生じているのか」を明らかにするために、ラマン・赤外・近赤外分光ならびに各種の蛍光顕微鏡観察手法を用いた研究をおこなう。その際、クマムシを対象として「乾燥耐性において実際に生じている現象」を、培養細胞を対象として「再構成系において、脱水・再水和過程で何が生じているのか」を明らかにしていく。また、リコンビナントタンパク質を用いた解析をおこなうことで、クマムシ細胞内で生じている現象が単純にタンパク質そのものの性状として理解することができるかを検証していく。

2. 研究の目的

本研究では、実際の乾燥耐性生物の脱水・再水和における細胞内変化の過程を、ラマン・赤外・近赤外分光ならびに各種の蛍光顕微鏡観察手法などの分光学的な手法により検証することを主な目的とする。また、これまで検証に使用されてきたヒト培養細胞などの再構成系において、脱水や再水和の過程で乾燥耐性動物とどのような違いが観察されるかを検証することも目的の一つとする。これにより、これまで誰も見ることができなかった、乾燥耐性機構が成立していく過程への理解を深める。

3. 研究の方法

本研究では、実際の乾燥耐性生物クマムシにおいて細胞内の観察または遺伝子編集 (ノックダウン/ノックアウト系) をおこなう目的で、まず、乾燥耐性をもつ微小動物クマムシにおける顕微注入技術の確立をおこなった。その際、色素や蛍光タンパク質などの導入により顕微注入の確認をおこなった。また、各種クマムシのゲノムデータと、これまでの発現量解析の結果を用いて、クマムシ細胞内で機能することが期待される遺伝子発現システムの構築を試みた。その結果、複数の遺伝子発現システムを構築することができた。これらの技術により、クマムシにおける外来遺伝子導入を世界で初めて成功させることができた。本遺伝子発現システムを用い、脱水過程においてクマムシ細胞内でどのような現象が生じるのかを検証するため、クマムシ内に発現する蛍光標識タンパク質を蛍光顕微鏡を用いてライブイメージング手法により観察した。

また、天然変性タンパク質の一つとして知られるクマムシ特異的なタンパク質は、構造を持たないことから既存の酵素タンパク質などの構造タンパク質とは違った機能を持つと考えられている。また、通常、生物のタンパク質は水系の環境に存在することを前提にしているが、乾燥耐性に関わるタンパク質はほぼ完全に脱水した環境において何らかの機能をもつと考えられる。このようなクマムシ特異的なタンパク質の性状を明らかにするために、精製したリコンビナントタンパク質において円二色性スペクトル解析や蛍光顕微鏡を用いた分光学的な解析をおこなっ

た。

4. 研究成果

上記の方法を用いて、緑色蛍光タンパク質(GFP)やクマムシタグ配列の導入などを試みることで、遺伝子編集に必須のタンパク質を導入することに世界で初めて成功した。上記で説明した本研究が確立したクマムシ特異的な遺伝子発現システムを用いることにより、クマムシ細胞内で機能することがわかった。この遺伝子発現システムは、複数のクマムシ種においても機能することがわかっており、非耐性種に耐性種のタンパク質を発現させるというクマムシにおける乾燥耐性の強化実験をおこなうことも可能になった。さらに、これまで不明確であった乾眠状態になるための遺伝子発現に必要な遺伝子発現調節システムについても、*in silico* 解析と併せて本遺伝子発現システムを用いることで、本質的な解析を行うことが期待される。本遺伝子発現システムにより光るクマムシが世界で初めて作成されたことは本研究の成果の一端を示すものであり、今後この遺伝子発現システムを用いることによってクマムシの研究は飛躍的に進展すると考えられる。

また、これまで再構成系に用いられていたクマムシ特異的な遺伝子産物について分光学的な性状解析をおこなった。精製したリコンビナントタンパク質において円二色性スペクトル解析をおこなうことで、クマムシ特異的なタンパク質の配列から予想されていた通りに、脱水環境においてらせん構造を形成することが示された。また、GFP 融合タンパク質を用いることで、それらを含む液滴の乾燥に伴い、液-液相分離様のドロップレット構造をとることが明らかになってきた。

乾燥耐性に関わるタンパク質の挙動をクマムシ細胞内で観察することで「乾燥耐性において細胞内でどのような現象が起きているのか」について世界で初めてライブイメージングに成功した。本研究が構築した技術は、乾燥耐性という、水がない、つまりはもはや生き物ではない、非常に特殊な生命現象についての研究に対して、ブレイクスルーをもたらすことができる解析手法である。本研究を通して、今後は、水を失い停止した生命活動が、どのような方法で復活していくのかを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tanaka Sae, Tsenkova Roumiana, Yasui Masato	4. 巻 324
2. 論文標題 Details of glucose solution near-infrared band assignment revealed the anomer difference in the structure and the interaction with water molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 114764 ~ 114764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molliq.2020.114764	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 Yagi-Utsumi Maho, Aoki Kazuhiro, Watanabe Hiroki, Song Chihong, Nishimura Seiji, Satoh Tadashi, Yanaka Saeko, Ganser Christian, Tanaka Sae, Schnapka Vincent, Goh Ean Wai, Furutani Yuji, Murata Kazuyoshi, Uchihashi Takayuki, Arakawa Kazuharu, Kato Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-00724-6	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 Murai Yumi, Yagi-Utsumi Maho, Fujiwara Masayuki, Tanaka Sae, Tomita Masaru, Kato Koichi, Arakawa Kazuharu	4. 巻 22
2. 論文標題 Multiomics study of a heterotardigrade, Echiniscus testudo, suggests the possibility of convergent evolution of abundant heat-soluble proteins in Tardigrada	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomics	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） 10.1186/s12864-021-08131-x	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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 ヨコヅナ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2次構造変化の解析
3. 学会等名 第五回クマムシ学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 Secondary structure analysis of the mitochondria localized heat-soluble protein MAHS & LEAM of an anhydrobiotic tardigrade; Ramazzottius varieornatus
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中冴
2. 発表標題 Analysis of the mitochondria localized heat-soluble protein, and attempt to knockdown and knockout in an anhydrobiotic tardigrade; Ramazzottius varieornatus
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sae Tanaka
2. 発表標題 Details of glucose solution near-infrared band assignment revealed using deuterium oxide and glucose isotopes
3. 学会等名 The 4th Aquaphotomics International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中冴、荒川和晴
2. 発表標題 Observation of liquid-liquid phase separation of the mitochondria localized heat-soluble protein MAHS & LEAM of an anhydrobiotic tardigrade; Ramazzottius
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中冨、荒川和晴
2. 発表標題 ミトコンドリア局在性熱可溶性タンパク質MAHS・LEAMにおける凝集・LLPS形成観察
3. 学会等名 第6回クマムシ学研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>[アウトリーチ活動]</p> <p>[1] サイエンスカフェ 蒲都市生命の海科学館、2021年2月、“最強生物”クマムシのひみつ、田中冨</p> <p>[2] 第31回自然科学研究機構シンポジウム、2021年3月、最強生物クマムシの仕組みを解き明かす、田中冨</p>
--

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
---------	---------