

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15971

研究課題名(和文)乾燥耐性を持つクマムシに学ぶ抗酸化ストレス戦略

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of putative antioxidant-related proteins from tardigrades

研究代表者

福田 庸太 (Yohta, Fukuda)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：20783179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乾燥耐性を持つ抗酸化活性関連タンパク質候補について構造機能相関解析を目指した。まず、乾燥時に発現量が上昇することが知られているクマムシ由来タンパク質RvLipolについて、X線結晶構造解析をおこなった。また、申請時には予定していなかったが、原核生物において活性酸素の除去に関与しているとされているタンパク質に構造が類似したクマムシ由来のタンパク質についても、X線結晶構造解析をおこなうとともに、分光学的測定や活性測定を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで立体構造的特性が不明であったクマムシ由来のタンパク質の構造を明らかにした。構造が決定されたクマムシタンパク質は、配列相同性からは既知のタンパク質とは異なると目されたが、構造的な類似性からは既知タンパク質と似た機能があると推定され、実際に銅用の生化学的特性を示すことが明らかになった。これはクマムシタンパク質は決して変わり者ではなく、ごく一般的な生物学的枠組みの一部であることを示しており、これらをクマムシの細胞外(例えばヒトなど)で応用するための一歩になったとも考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is structural and functional analyses of tardigrade proteins that are probably related to oxidative stress tolerances. X-ray crystallographic analysis was performed on a tardigrade protein whose expression level is known to increase under desiccated conditions. Although not planned at the time of application, we performed X-ray crystallographic analysis, spectroscopic measurements, and activity measurements of another protein from tardigrades, which is structurally similar to a protein that is thought to be involved in the removal of reactive oxygen species in prokaryotes.

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クマムシは体長 1 mm 以下ながら脳も有する複雑な動物で、陸生クマムシの多くは脱水収縮し、「樽 (Tun) 構造」を形成して乾眠とよばれる無代謝状態 しばしば無生物状態 になることで乾燥に耐える (図 1)。乾眠状態のクマムシは、極低温・高温・真空・高圧などへの暴露に耐え (Horikawa et al. Astrobiology. 2008) 高放射線量環境下の宇宙でも生存できる。そして、乾眠状態のクマムシは吸水することで平然と活動状態へ戻り、生殖も可能である。この驚異的な乾眠現象の研究は、基礎生物学的な興味に留まらず、細胞・臓器・食品・医薬品の長期保存や、宇宙進出技術につながるかもしれないと期待されている。クマムシは多数のタンパク質の働きによって乾眠を可能にしているとされるが、クマムシタンパク質の多くが、他の生物由来タンパク質との類似性が低く、構造や機能に不明な点が多いことを示している。本研究で注目したのは、極度乾燥時や放射線暴露時の極めて深刻な酸化ストレスをクマムシがどのように切り抜けているかということである。クマムシの中でもとりわけ高い耐性をもつヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) のゲノムに存在する、興味深いクマムシ固有の抗酸化関連タンパク質について研究をおこなうこととした。これらは、ペルオキシレドキシシン (RvPrx) と機能不明リポカリンタンパク質 (RvLipo) である。Prx は過酸化水素分解酵素で、抗酸化作用に直接関与するため、クマムシには必須の酵素と言えよう。奇妙なことに、RvPrx では、既知のあらゆる Prx で活性残基として不可欠とされるシステインのひとつをもたないが、先行研究のトランスクリプトームデータによれば、RvPrx 遺伝子は比較的多く、そしてコンスタントに転写されており、重要な酵素である可能性が高い。RvLipo は、甲殻類の抗酸化関連タンパク質・クラスチアニンと低い類似性のあるアミノ酸配列を持つ。

### 2. 研究の目的

近年のゲノム解析により、クマムシ固有の乾眠関連候補タンパク質が多数見つかってきているにも関わらず、クマムシ固有のタンパク質がどのような構造・性質を持ったタンパク質であるのかについての情報はほとんどなく、「各種乾眠関連タンパク質がどのようにはたらいて乾眠状態や高耐性を実現するのか」という分子機構については、明らかにされていない。そこで、クマムシ固有タンパク質の構造機能解析が、この知的隔たりを埋めるものとして期待される。これまで個体や遺伝子発現のレベルでは精力的に研究されてきたクマムシの乾眠であるが、その基盤を分子構造情報から明らかにする申請者の研究は「原子レベルから乾眠を科学する」という新しい視点を与えるものである。本研究では特にヒトに対しても様々な応用が期待できる酸化ストレス耐性に着目し、クマムシ固有酸化ストレス耐性関連タンパク質の構造と機能を明らかにし、乾眠や耐放射線機構を支える分子基盤に関する知見を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### i) RvPrx

##### 1) 立体構造解析

Prx 発現系には、安価に大量のサンプルが得られる大腸菌を用いた。コドン最適化をおこなった人工合成遺伝子を発現用ベクターに組みこみ、RvPrx を発現させた。RvPrx の発現・精製をおこない、複数の条件で RvPrx の結晶を得た。また、X 線小角散乱によって溶液構造解析もおこなった。

##### 2) 活性測定

精製サンプルを用いて過酸化水素消去能についての活性測定をおこなった。本研究ではジチオトレイトールを人工還元剤とし、Prx 活性測定系として一般的な FOX アッセイシステムを利用した。各変異体と野生型の活性を比較した。

#### ii) RvLipo

##### 1) 結合実験

RvLipo 発現系には、安価に大量のサンプルが得られる大腸菌を用いた。コドン最適化をおこなった人工合成遺伝子を発現用ベクターに組みこみ、RvLipo を発現させた過去の類似タンパク質の研究を参考に、ビリベルジンやビルルピンなど、RvLipo のリガンドと予想される物質と結合させ、その紫外可視吸収スペクトルを測定した。

##### 2) 立体構造解析

高純度に精製した RvLipo を用いて、RvLipo の結晶を作製し、X 線結晶構造解析により、その立体構造を解明した。さらに、1) で結合が確認されたリガンドとの複合体の結晶構造解析をおこない、どのアミノ酸残基が結合に関与しているのかといったような構造機能相関を議論するためのさらなる構造基盤を得ることを目指した。

### 4. 研究成果

#### i) RvPrx

過酸化水素消去反応に重要なアミノ酸を失っているにもかかわらず、RvPrx は低いながらも過酸

化水素消去活性を持っていることが示唆された。また、RvPrx の立体構造及び変異体の立体構造を 2 分解能で決定した。位相決定には既知の Prx の構造を利用した分子置換法が適用可能であった。全体構造は既知の Prx に見られるような、ダイマー構造が 5 量体化した 10 量体構造であり、N 末端に存在すると予想されていたフレキシブルな領域の電子密度は確認されなかった。野生型の活性中心の構造は配列から予想されたとおりにシステインが存在しておらず、既知の Prx とは異なるものであった。特筆すべき構造的特徴として、システインの代わりに存在しているグルタミン酸が主鎖と水素結合していた。

#### ii) RvLipo

RvLipo は複数のジスルフィド結合を有しており、組み換えタンパク質を発現する大腸菌株 (SHuffle T7) を適切に選択することでのみ大量発現が可能であった。精製タンパク質を用い、ビリベルジン、ビリルビンおよびヘムの結合を確認した。これらの化合物は溶液中と RvLipo 存在下では紫外可視吸収スペクトルに違いが見られ、RvLipo と結合することが示唆された。X 線結晶構造解析もおこなった。配列類似性が構造既知のタンパク質と低いためか、分子置換法による位相決定と構造解析が難航した。そこで結晶化条件に亜鉛が含まれる結晶から異常分散情報を持ったデータを収集し、SAD 法により位相決定をおこない、構造精密化まで完了した。また、リガンドの一つであり抗酸化物質であるビリベルジンが結合した状態のサンプルを調製する方法を確立した。結晶化をおこない、得られた結晶を用いて構造解析をおこなった。得られた結晶はビリルビン由来の青緑色を呈しており、精密化後の構造ではバレル構造上部のループ領域が Apo 型から構造変化していたが、ビリベルジンの電子密度は観測されなかった。X 線照射の際に、結晶の色が黄色へと変色することが判明しており、強力な X 線の照射によるビリベルジンの還元反応などの化学反応が結晶中で進行したと推測された。そこで、RvLipo と似た立体構造をとる他のビリベルジン結合タンパク質との構造比較から、ビリベルジンのおおよその結合位置を推測するとともに、結晶中での還元反応が進行しにくいと期待できる変異体の作製をおこない、これら変異体を精製した。この変異体タンパク質の溶液の紫外可視吸収スペクトルは野生型のビリベルジン結合型ものとは異なっていたことから、リガンドの結合様式が変化したものと推定された。変異体は野生型と同様の条件では (野生型結晶を種結晶として用いても) 結晶化できなかったため、新たに結晶化条件のスクリーニングを行った。結晶化を開始してからおよそ 1 年後にタンパク質のものと思われる結晶の生成を確認したが、これを X 線回折実験に用いたところ、回折点は得られなかった。

#### iii) その他

申請時には予定していなかったが、原核生物において活性酸素の除去に関与しているタンパク質に構造が類似したクマムシタンパク質についても、X 線結晶構造解析をおこなった。本タンパク質の遺伝子は乾燥耐性を持つクマムシに複数見られ、本研究ではそのうち 2 種について構造決定をおこなうとともに、分光学的測定を実施した。また、クマムシ以外の生物 (植物、菌類、古細菌) が有するオーソログについて X 線構造解析と分光学的測定をおこなった。クマムシ由来タンパク質とその他の生物由来のタンパク質の構造を比較したところ、全体構造に大きな違いは見られなかったが、活性中心と思しき部位の局所構造を比較すると、顕著な差が見られた。また、本クマムシタンパク質結晶をジチオトレイトールを用いて還元した場合に、推定活性中心の構造変化と、推定活性中心から遠く離れたアルファヘリックス部位の構造変化がみられることが明らかになり、これらの構造変化は本タンパク質の生理的な機能と関連していることが予想された。

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 Fukuda Yohta, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Structural insights into a C2 domain protein specifically found in tardigrades	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 513 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4002	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 Kobayashi Kazuo, Kim JeeEun, Fukuda Yohta, Kozawa Takahiro, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Fast autooxidation of a bis-histidyl-ligated globin from the anhydrobiotic tardigrade, Ramazzottius varieornatus, by molecular oxygen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvab003	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 Fukuda Yohta, Kim JeeEun, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Structure of cytochrome b5 unique to tardigrades	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1829 ~ 1835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3896	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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