

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21710223

研究課題名（和文）

動物における乾燥耐性・極限環境耐性機構のプロテオーム解析

研究課題名（英文）

Proteomic analysis of anhydrobiotic and extremotolerant animal

研究代表者

國枝 武和（東京大学・大学院理学系研究科、助教）

研究者番号：10463879

研究成果の概要（和文）：

ヨコヅナクマムシの持つ高い乾燥耐性・極限環境耐性を支えるタンパク質の候補として、加熱しても凝集しないクマムシ固有のタンパク質群を初めて同定し、これらのタンパク質群が乾燥前から大量に発現していることを明らかにした。また、同様の性質を持つタンパク質が乾燥耐性の弱いクマムシにおいても存在することを見出し、その凝集温度と乾燥耐性との間に一部相関関係が見られることを明らかにした。また、放射線耐性に関わるタンパク質の候補として、クマムシのクロマチン分画を分離し、中に含まれるタンパク質群を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We identified several novel anti-aggregation proteins from an anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus* and revealed that these proteins were expressed abundantly even in active state. Although these proteins were found in less-tolerant taridirades, there are some correlation between their denaturing temperature and desiccation-tolerance. Our identified proteins are good basis to elucidate the molecular mechanism of anhydrobiotic ability and extremotolerance of tardigrades.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：極限生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プロテオミクス、クマムシ、極限環境耐性、乾眠、放射線耐性、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

クマムシが乾燥耐性・極限環境耐性をもつことは約200年前から知られていたが、その分子メカニズムはまったくと言って良いほど分かっていなかった。乾燥耐性には糖の一種であるトレハロースが乾燥中に大量に蓄積して生体を保護するという説が定説とさ

れていたが、乾燥耐性に必ずしもトレハロースを必要としないこと、多くのクマムシ類における乾燥時のトレハロース蓄積量はそれほど顕著ではないことが明らかとなり、トレハロース以外の乾燥耐性機構の存在が示唆されていた。ヨコヅナクマムシは本邦の札幌市から採取された種で、耐性が高いクマ

ムシの中では比較的容易に飼育できることから、耐性の分子メカニズムを解析するモデル種として、ゲノム解読が開始されていた。クマムシは体長がおおむね 1mm 以下の微小な動物でサンプル量を潤沢に供給するのは必ずしも容易ではなかったが、当時から著しい高感度化が進められている質量分析法をゲノム情報と組み合わせることで、耐性に関わる候補タンパク質を分離できれば、比較的微量でもタンパク質を同定することが可能になると期待された。そこで、本研究では主に以下の2つの耐性能力に着目し、耐性関連タンパク質の分離・同定を試みた。

(1) 乾燥耐性に関わる候補タンパク質

植物の種子で大量に蓄積する LEA タンパク質は一部の乾燥耐性動物にも存在し乾燥時に著しく発現誘導されることから、乾燥耐性への関与が指摘されている。LEA タンパク質は親水性が高く、変性条件である高温に曝露しても凝集しない性質（抗凝集性）を持つことが知られている。乾燥も変性ストレスの一種であることから、こうした抗凝集性は乾燥耐性に寄与する性質と考えられた。しかしながら、クマムシでは、このような性質を持つタンパク質が発現しているかは明らかにされていなかった。

(2) 放射線耐性に関わる候補タンパク質

放射線は、生体の遺伝情報を担う DNA に傷害を与えることが知られており、とりわけ 2 本鎖切断は正確な修復が困難なため最も重篤な障害と考えられている。一部の放射線耐性細菌では強力な DNA 修復能力を持つことが知られており分子機構の解析が進められているが、クマムシを含めてゲノム DNA がクロマチン構造をとる真核生物において高い放射線耐性を支えるメカニズムは全くと言って良いほど明らかにされていない。

2. 研究の目的

クマムシの持つ乾燥耐性・極限環境耐性の分子基盤の一端を明らかにするために、耐性能力に関与する候補として以下の2種のタンパク質群を探索・同定し、その性状解析を目的とした。

(1) 抗凝集性タンパク質

乾燥耐性に関わる候補タンパク質として、加熱しても凝集しない抗凝集性に着目しヨコヅナクマムシからタンパク質を探索する。

(2) クロマチン分画タンパク質

放射線耐性に関わる候補タンパク質として、クロマチン分画に含まれるタン

パク質を同定し、放射線耐性関連タンパク質を探索する。

3. 研究の方法

(1) 抗凝集性タンパク質

成体のヨコヅナクマムシを、エサの混入を避けるために2日間絶食した後、滅菌蒸留水で入念に洗浄し、緩衝生理食塩水中で破碎した。遠心操作により分離した可溶性タンパク質画分を 92°C 10 分間で処理した後、再度遠心により上清と沈殿に分離し、SDS-PAGE により解析した。得られた候補バンドを個別に切り出し、LC-MALDI-TOF/TOF 法により、MS/MS スペクトルの解析を行った。質量データを当時解読途中であったドラフトゲノム配列に照合し、該当する部分塩基配列を特定、RACE 法により全長 cDNA 配列を決定した。決定した配列をもとに大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を合成し、抗凝集性アッセイ、および円偏光二色性(CD)スペクトル解析に供した。CD 解析は、ネイティブ条件のほか、加熱処理後・有機溶媒添加・界面活性剤添加時についても行い、ストレス環境下での高次構造変化についても解析した。

(2) クロマチン分画タンパク質

絶食・洗浄したクマムシをダウンスホもジェナイザーで破碎後、遠心により細胞質分画と核分画に分離した。低張液で核を破裂させた後、遠心沈殿分画としてクロマチン分画を分離した。得られた分画を SDS-PAGE で分離し、クロマチン分画に選択的に濃縮されているバンドを切りだして、nanoLC-ESI-Q-TOF により MS/MS スペクトルを得た。クマムシのデータベースと照合した結果、多数のタンパク質を同定した。細胞内局在の解析は、gfp 融合タンパク質を昆虫培養細胞に発現させ、gfp の蛍光を観察することにより行った。

4. 研究成果

(1) 抗凝集性タンパク質

活動状態のクマムシ抽出液から 92°C に加熱しても凝集・沈殿しない抗凝集性タンパク質を探索した。その結果、加熱後の遠心上清から SDS-PAGE 上メジャーな 3 本のバンドを見出した。これらのバンドは加熱前のサンプルでもほぼ同じ強度のバンドとして検出されたことから、抗凝集性を示すタンパク質と考えられた。またこれらのバンドは加熱前のサンプルにおいても強度の強い明瞭なバンドとして検出されたことから、活動状態において常に大量に発現するタンパク質であると考えられた。これらのバンドを質量分析した結果をもとに、対応する cDNA の全長配列を決定したところ、一次構造上 3

つのファミリーに分類される 5 種の新規タンパク質を同定した。これらはいずれも、既知のモチーフ (Pfam-A) を含まず、他種のタンパク質との相同性も無いが、もしくは非常に低かったことから、クマムシ固有のタンパク質と考えられた。次に、決定した遺伝子配列をもとにリコンビナントタンパク質を大腸菌を用いて合成し、抗凝集性を示すかを検証した結果、3 つのファミリーいずれも加熱後上清に残存したことから、これらのタンパク質はクマムシ抽出液由来の物質が無くても、それ自体が抗凝集性を持つことが示された。得られた配列をもとにクマムシゲノムに対して相同性検索を行った結果、3 つのファミリーに属する遺伝子 (パラログ) は今回同定した 5 種のタンパク質以外に数多く存在することが分かった。これらクマムシ固有の遺伝子は、クマムシの進化の過程で重複を起こしたと考えられることから、耐性などクマムシ特有の性質に重要な役割を担う可能性がある。また、クマムシゲノム配列から LEA モチーフを持つ遺伝子が見出されたため、そのリコンビナントタンパク質を合成したところ、他種の LEA タンパク質と同様に抗凝集性を持つことが分かった。しかしながら、ヨコヅナクマムシ個体を用いた抗凝集性タンパク質の探索では質量分析においても LEA タンパク質が見出されなかったことから、クマムシの主要な抗凝集性タンパク質は LEA ではなく、今回同定した固有のタンパク質が担っていると考えられる。

今回同定した抗凝集性タンパク質についてコンピュータプログラム (FoldIndex) により高次構造を予測したところ、非構造領域を多く含むことが予想された。そこで円偏光二色性スペクトル解析により、これらのタンパク質が持つ 2 次構造の含量を測定した。これらのスペクトルは熱処理によって変化しなかったが、界面活性剤・有機溶媒添加により大きく変化し、構造が変化することが分かった。

また、こうした抗凝集性タンパク質の進化上の起源を調べる目的で、日本で飼育されているクマムシのうち分類上同じ目に属し乾燥耐性能力の弱い、もしくは無いクマムシ種から同様のアッセイにより抗凝集性タンパク質を探索した。その結果、高温条件をやや低く設定した場合には、耐性の弱い・無い種いずれからも抗凝集性タンパク質群が見出された。一方で、温度を 100 度まで上げると、耐性の弱いクマムシの抗凝

集性タンパク質群は一部を除いて凝集沈殿し、耐性の無い種ではすべてが沈殿した。ヨコヅナクマムシと同じ目に属する種については高温における抗凝集性と乾燥耐性との間に相関関係が見られることが分かった。

(2) クロマチン分画タンパク質

クマムシは活動状態においても高い放射線耐性を持つことから、放射線の主要な障害標的である DNA を保護・修復する能力が高いことが想定された。この能力に関わる候補タンパク質を同定する目的で、クマムシからクロマチン分画を分離し、この分画に選択的なバンドについて質量分析により候補タンパク質群を同定した。これらのタンパク質の細胞内局在を調べるために、一部のタンパク質について *gfp* 融合発現コンストラクトを作成し、培養細胞に発現させた。その結果、ひとつのタンパク質の局在がゲノム DNA 全体の領域とほぼ一致することが明らかになった。このタンパク質は既知のドメインを持たず、相同な配列を持つ既知タンパク質も見出されなかったことから、クマムシ固有のタンパク質と考えられた。ゲノム DNA 全体と共局在することで DNA の保護や修復の促進し、クマムシの放射線耐性に寄与している可能性がある。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 國枝武和、『極限環境耐性動物クマムシのゲノム解析と機能プロテオミクス』、沖縄知的クラスター形成シンポジウム (招待講演)、2011 年 1 月 29 日、那覇
- ② 國枝武和、『極限環境耐性動物クマムシの分子生物学的解析基盤の創成』、第 11 回極限環境生物学会 (奨励賞受賞講演)、2010 年 11 月 16 日、京都
- ③ 國枝武和、『極限環境耐性動物ヨコヅナクマムシ由来の抗凝集性タンパク質の解析』、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 25 日、東京
- ④ 國枝武和、”Genome analysis and functional proteomics of anhydrobiotic extremotolerant tardigrade, *Ramazzottius cf. varieornatus*.”、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、横浜
- ⑤ 山口理美、” The analysis of anti-aggregation proteins from

tardigrades with desiccation tolerance.”、第32回日本分子生物学会、2009年12月9日、横浜

- ⑥ 山口理美、『乾燥耐性を持つクマムシ由来の抗凝集性タンパク質の解析』、第10回極限環境微生物学会、2009年10月28日、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/saibou/kuma/>

アウトリーチ活動

- ① 爆笑問題のニッポンの教養(2010年8月3日、NHK総合)
② ミニゲノムひろば(2009年12月10日、福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國枝 武和(東京大学・大学院理学系研究科、助教)

研究者番号：10463879