

“地上最強生物”クマムシの乾眠の分子機構の解明に挑む

矢木 真穂^{1,2}, 加藤 晃一^{1,2}

1. はじめに

特定の生物が乾燥や極低温などの厳しい環境に対して生命活動を停止する無代謝状態をクリプトビオシス (cryptobiosis, 「隠された生命活動」の意) というが、その中でも乾燥条件に応答して誘導されるのが「乾眠」である¹⁾。乾眠状態にある生物は、すべての代謝が停止した状態で乾燥した環境を生き延び、給水すると乾眠状態から活動状態へと復帰し、代謝を再開する能力を持っている (図1)。さらに、乾眠状態では、乾燥に加えて、温度、圧力、放射線、化学物質といった極限環境条件に対しても強い耐性を示すことが知られている。したがって、乾眠機構を明らかにすることは、生命の環境適応の分子戦略を理解する上で重要な手がかりを与えるとともに、ワクチンや細胞などの新たな保存方法を提供することが可能となり、医療やバイオテクノロジーへの応用研究の推進にもつながることが期待される。

乾眠生物の中でも、緩歩動物門に属するクマムシは、特に強い乾燥耐性および極限環境耐性を有することが知られており、しばしば“地上最強生物”と呼ばれる (図1)。クマムシのゲノム解析により、クマムシの乾眠関連遺伝子として複数の遺伝子が発見され、クマムシ固有のタンパク質の存在が浮き彫りとなってきた²⁾。しかしながら、乾燥耐性におけるそれらのタンパク質の役割はほとんど明らかとされていなかった。本稿では、クマムシ固有タンパク質に着目し、クマムシの環境適応戦略について紹介する。

2. クマムシの環境適応戦略～クマムシ固有タンパク質～

クマムシのストレス環境に対する防御メカニズムとして、熱ショックタンパク質もしくは低温ショックタンパク質の誘導や、ペルオキシダーゼの誘導、また、筋タンパク質フィラメントによる体構造の安定化や再編成など、これまでにいくつかのメカニズムが提唱されている^{1,3)}。線虫、ネムリユスリカ、アルテミアなど、乾眠生物の中には脱水時に細胞内に高濃度のトレハロースを蓄積し、水分保持やガラス化を通じて乾燥耐性を示すものもある¹⁾が、クマムシの場合はトレハロースの蓄積レベルは種によって異なっており、トレハロースの蓄積だけでは乾眠の仕組みを説明できない。一方、LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質は、もともと植物から発見されたタンパク質で、種子の乾燥耐性に関わっていることが知られている。LEAタンパク質は高い親水性と熱可溶性を有する天然変性タンパク質であり、乾燥時における役割として、トレハロースによるガラス化の補強や水分保持、他のタンパク質の変性・凝集保護といったいくつかの仮説が提唱されている⁴⁾。近年、LEAタンパク質は線虫やワムシといった一部の乾眠動物においても発見され、植物だけでなく動物の乾燥耐性獲得にも関与していることが示唆されている⁴⁾。しかしながら、クマムシのトランスクリプトーム解析の結果、LEAタンパク質遺伝子はクマムシ種の広範にわたって保存されているものの、転写産物としては必ずしも豊富ではないことが明らかとなった⁵⁾。これらのことから、クマムシの乾眠メカニズムは他の動物とは異なり、何かしらのクマムシ独自の成分を使って乾燥耐性を獲得している可能性が示唆された。

¹名古屋市立大学大学院薬学研究科 (〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1)

²自然科学研究機構生命創成探究センター (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山5-1)

Towards understanding the molecular mechanisms of anhydrobiosis in tardigrades, “the strongest organisms on earth”

Maho Yagi-Utsumi^{1,2} and Koichi Kato^{1,2} (¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan, ²Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940888

© 2022 公益社団法人日本生化学会



図1 クマムシは生育環境から水がなくなると「乾眠」と呼ばれるすべての代謝が停止した状態となることで乾燥した環境において生き延び、給水すると乾眠状態から復帰して代謝を再開する能力を持っている。クマムシ画像は荒川和晴博士より提供

近年、クマムシの全ゲノム情報が決定され、陸生のクマムシの一種であり高い乾燥耐性を示す *Ramazzottius varieornatus* (ヨコヅナクマムシ) においては全体の約40%は他の生物種の遺伝子とは相同性を示さないクマムシ固有の遺伝子であることが判明している^{2,5)}。熱可溶性タンパク質のファミリーとして、CAHS (cytosolic abundant heat-soluble) タンパク質、SAHS (secretory abundant heat-soluble) タンパク質、MAHS (mitochondria abundant heat-soluble) タンパク質などが見つかった^{1,2,6,7)}。その他にも、放射線照射に伴うDNA傷害に対して保護作用を有するDsup (damage suppressor) タンパク質⁸⁾や、ゴルジ体に局在して抗酸化作用に関わるマンガン依存性ペルオキシダーゼ⁹⁾が同定され、これらのクマムシ固有タンパク質がさまざまなストレス耐性に関与していることが明らかとなってきた。

3. CAHS タンパク質

CAHS 遺伝子は、*R. varieornatus* や *Hypsibius exemplaris* が属する真クマムシ綱のすべての種において保存されている。*R. varieornatus* は、水分を消失した状態においても細胞を保護するために、CAHS タンパク質をはじめとするいくつかのクマムシ固有のタンパク質を恒常的に発現し、細胞内に常備していると考えられている^{2,5)}。一方、*H. exemplaris* では、CAHS タンパク質は乾燥ストレス条件下で強く誘導されることが示されている^{2,5,10)}。異クマムシ綱においてはCAHS 遺伝子の発現は認められなかったが、同綱に属する *Echiniscus testudo* のマルチオミクス研究により、二つの新規熱可溶性タンパク質ファミリーが同定された¹¹⁾。これらのタンパク質は、CAHS とはアミノ酸配列の相同性はないものの、CAHS タンパク質と類似の構造的特徴を有していることが明らかとなっている。したがって、CAHS タンパク質そのものの保存性は低いものの、類似タンパク質の存在まで考慮すると、CAHS (およびCAHS-like) タンパク質は、すべてのクマムシに共通な乾眠関連分子である可能性が高い。

我々は、*R. varieornatus* 由来のCAHS タンパク質のアイソフォームの一つであるCAHS1を対象に、*in vitro* および *in vivo* における分子集合体の形成について、一連の分光学的手法および顕微鏡観察により解析した¹²⁾。その成果を以下に紹介する。

1) CAHS1 タンパク質の *in vitro* における繊維形成

CAHS1 タンパク質のN末端領域はランダム構造をとり、C末端領域は α ヘリックス構造をとることがアミノ酸配列より予測されていたが、NMR解析の結果から、C末端領域は、実際はモルテングロビュール状態にあり、緩い α ヘリックス構造を形成していることが判明した(図2A)。そ

して、CAHS1 タンパク質の濃度を上げるにつれてNMRピークが消失していき、最終的にN末端側に位置する天然変性領域に由来するピークのみが観測された。このことから、CAHS1 タンパク質は高濃度条件下においてC末端側の α ヘリックス領域を介して会合し、N末端領域は高い運動性を保っていることがわかった(図2A)。実際、CAHS1 タンパク質は高濃度でゲル化し、希釈すると可逆的に可溶化することがわかった(図2B)。高速原子間力顕微鏡を用いて、このゾル-ゲル転移現象をリアルタイムで観察したところ、希薄な条件下ではCAHS1 タンパク質は球状領域および柔軟な天然変性領域からなる単量体であり、高濃度条件下ではCAHS1 タンパク質が自発的に集合し繊維状の構造体を形成していくようすを捉えることができた(図2C)。一方、赤外分光分析および電子顕微鏡観察の結果から、CAHS1 タンパク質は脱水に伴って α ヘリックス構造の形成と同時に繊維化し、乾燥条件下においても繊維構造を維持していることが示唆された(図2D)。

以上の実験データから、クマムシの細胞内に豊富に存在するタンパク質CAHS1は、脱水が引き金となってC末端領域の α ヘリックス構造を介して自発的に集合して繊維構造を形成し、ハイドロゲルの形成に至ること、さらに、そのような繊維状の構造体は乾燥状態においても保持され、給水に伴って解離して単量体に戻ることが明らかとなった。これらのことから、CAHS1 タンパク質はハイドロゲル化することにより水分を保持し、代謝などの生命活動が強制終了しないように、緩やかに乾眠に誘導するのに役立っていることが想定される。一方、乾燥状態においては、CAHS1 タンパク質の網目状の繊維構造体は、緩衝材のように細胞内に張り巡らされた状態で細胞の構造維持に役立っているとともに、“ドライシャペロン”として乾燥に弱いタンパク質を変性から保護したり、オルガネラ機能の完全性の維持に関与している可能性がある。さらに、給水過程においては、繊維構造体からハイドロゲルを経て単量体に解離していくことで、生命活動の再開を適切に調整しているのかもしれない。

2) CAHS1 タンパク質の *in vivo* における可逆的な集合体形成

筆者らは、CAHS1 タンパク質が細胞内の分子クラウディング条件下において繊維構造を形成する可能性について検討した。遺伝子組換えタンパク質としてCAHS1 タンパク質を大腸菌に過剰発現させたところ、本タンパク質が大腸菌の細胞内においても繊維構造を形成することが確認された。さらに、蛍光タンパク質を融合したCAHS1 タンパク質をヒト由来の培養細胞に過剰発現し、高浸透圧ストレスをかけると、細胞質全体に均一に分布していたCAHS1 タンパク質が、細胞質および核において速やかに

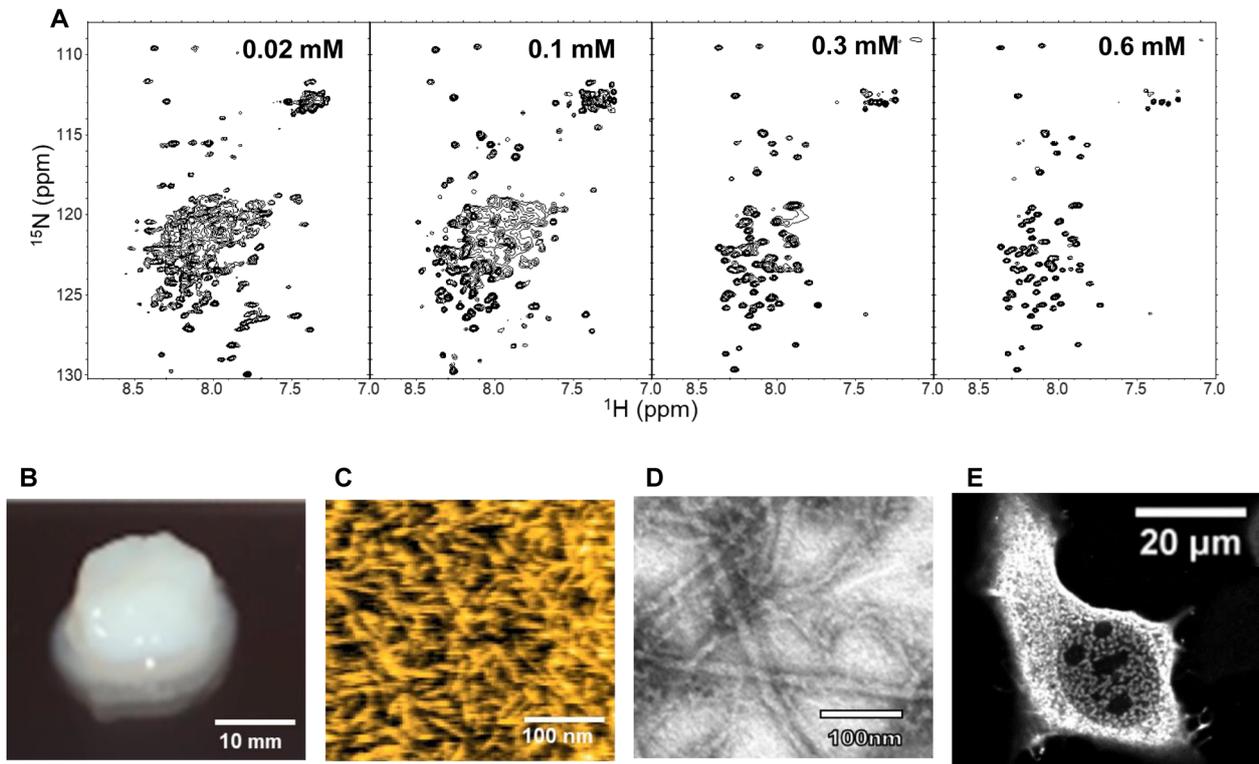


図2 クマムシに豊富に存在するタンパク質CAHS1の*in vitro*および*in vivo*における集合体形成
 (A) CAHS1タンパク質は高濃度で会合し、0.6 mMの条件下ではN末端側に位置する天然変性領域に由来するNMRピークのみが観測された。CAHS1タンパク質は高濃度で(B)ゲルや(C)繊維を形成し、(D)乾燥状態においても繊維構造を保持していた。一方、高浸透圧ストレスをかけると、(E)細胞内に粒子状の集合体を形成するようすが観察された。文献12より引用・改変。

集積して粒子状の集合体を形成し、ストレスがなくなるとこうした集合体は消失して元の状態に戻ることが明らかとなった(図2E)。こうしたCAHS1タンパク質の集合体が細胞質で形成するコアセルベート様の液滴は、脱水過程において、脱水ストレスから他の生体分子を保護するための可逆的な“保護区画”を形成し、乾燥耐性に寄与している可能性がある。

以上のように、CAHS1タンパク質の段階的な繊維状のネットワーク構造体の形成は、本タンパク質が乾燥に至る各ステップにおいて、“水分保持”、“保護区画の形成”、“ドライシャペロン”、“細胞の構造維持”といった多面的な役割を担っている可能性を示唆するものである。

4. 今後の展望

本稿ではCAHS1を対象とした研究成果を紹介したが、実際*R. varieornatus*は少なくとも16種類のCAHSタンパク質アイソフォームを発現していることが知られている^{2,5}。最近、CAHS3やCAHS12に関して、*in vitro*で可逆的にゾル-ゲル転移を起こすことや、培養細胞において高浸透圧ストレスに応答して可逆的に重合して繊維化すること

などが報告されている¹³。したがって、一連のCAHSタンパク質アイソフォームは、それぞれ異なる集合体としての特性を発揮し、乾眠過程において異なる役割を協調的に担っている可能性が考えられる。さらに、*H. exemplaris*のCAHS8(CAHS D)は繊維構造からなるゲルを形成すること¹⁴、*H. exemplaris*のCAHS3や*Paramacrobiotus richtersi*のCAHS2は液滴を形成すること¹⁵などが相次いで報告されており、CAHSタンパク質の環境依存的な集合・離散に伴う繊維化、液滴化、ゲル化といった分子集合体の形成は、クマムシに共通な環境適応戦略として重要であると考えられる。今後、クマムシ固有タンパク質の包括的な構造機能解析がますます重要になってくるだろう。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、ExCELLS課題研究(No. 18-207, 19-208, 19-501)のサポートのもと、青木一洋教授(ExCELLS/基礎生物学研究所)、村田和義特任教授(ExCELLS/生理学研究所)、内橋貴之教授(ExCELLS/名古屋大学)、荒川和晴教授(ExCELLS/慶應義塾大学)、古谷祐詞准教授(分子科学研究所/現名古屋工業大学)およびそのグループメンバーと共同で行ったものである。

また、学術変革領域研究(A)「非ドメイン生物学」における研究活動(JP22H05615)を通じて、知的刺激を享受している。筆者らのグループ(ExCELLS/名市大)のメンバーおよび共同研究者の方々にこの場を借りて感謝申し上げる。

文 献

- Hibshman, J.D., Clegg, J.S., & Goldstein, B. (2020) Mechanisms of desiccation tolerance: Themes and variations in brine shrimp, roundworms, and tardigrades. *Front. Physiol.*, **11**, 592016.
- Arakawa, K. (2022) Examples of extreme survival: Tardigrade genomics and molecular anhydrobiology. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, **10**, 17–37.
- Møbjerg, N. & Neves, R.C. (2021) New insights into survival strategies of tardigrades. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **254**, 110890.
- Hand, S.C., Menze, M.A., Toner, M., Boswell, L., & Moore, D. (2011) LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annu. Rev. Physiol.*, **73**, 115–134.
- Yoshida, Y., Koutsovoulos, G., Laetsch, D.R., Stevens, L., Kumar, S., Horikawa, D.D., Ishino, K., Komine, S., Kunieda, T., Tomita, M., et al. (2017) Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varicornatus*. *PLoS Biol.*, **15**, e2002266.
- Yamaguchi, A., Tanaka, S., Yamaguchi, S., Kuwahara, H., Takamura, C., Imajoh-Ohmi, S., Horikawa, D.D., Toyoda, A., Katayama, T., Arakawa, K., et al. (2012) Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. *PLoS One*, **7**, e44209.
- Tanaka, S., Tanaka, J., Miwa, Y., Horikawa, D.D., Katayama, T., Arakawa, K., Toyoda, A., Kubo, T., & Kunieda, T. (2015) Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic Tardigrade improve osmotic tolerance of human cells. *PLoS One*, **10**, e0118272.
- Hashimoto, T. & Kunieda, T. (2017) DNA protection protein, a novel mechanism of radiation tolerance: Lessons from tardigrades. *Life (Basel)*, **7**, 26.
- Yoshida, Y., Satoh, T., Ota, C., Tanaka, S., Horikawa, D.D., Tomita, M., Kato, K., & Arakawa, K. (2022) Time-series transcriptomic screening of factors contributing to the cross-tolerance to UV radiation and anhydrobiosis in tardigrades. *BMC Genomics*, **23**, 405.
- Boothby, T.C., Tapia, H., Brozena, A.H., Piszkiwicz, S., Smith, A.E., Giovannini, I., Rebecchi, L., Pielak, G.J., Koshland, D., & Goldstein, B. (2017) Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation. *Mol. Cell*, **65**, 975–984.e5.
- Murai, Y., Yagi-Utsumi, M., Fujiwara, M., Tanaka, S., Tomita, M., Kato, K., & Arakawa, K. (2021) Multiomics study of a heterotardigrade, *Echiniscus testudo*, suggests the possibility of convergent evolution of abundant heat-soluble proteins in Tardigrada. *BMC Genomics*, **22**, 813.
- Yagi-Utsumi, M., Aoki, K., Watanabe, H., Song, C., Nishimura, S., Satoh, T., Yanaka, S., Ganser, C., Tanaka, S., Schnapka, V., et al. (2021) Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade. *Sci. Rep.*, **11**, 21328.
- Tanaka, A., Nakano, T., Watanabe, K., Masuda, K., Honda, G., Kamata, S., Yasui, R., Kozuka-Hata, H., Watanabe, C., Chinen, T., Kitagawa, D., Sawai, S., Oyama, M., Yanagisawa, M., & Kunieda, T. (2022) *PLoS Biol.*, **20**, e3001780.
- Malki, A., Teulon, J.M., Camacho-Zarco, A.R., Chen, S.W., Adamski, W., Maurin, D., Salvi, N., & Blackledge, M. (2022) Intrinsically disordered tardigrade proteins self-assemble into fibrous gels in response to environmental stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **61**, e202109961.
- Veling, M.T., Nguyen, D.T., Thadani, N.N., Oster, M.E., Rollins, N.J., Brock, K.P., Bethel, N.P., Lim, S., Baker, D., Way, J.C., et al. (2022) Natural and designed proteins inspired by extremotolerant organisms can form condensates and attenuate apoptosis in human cells. *ACS Synth. Biol.*, **11**, 1292–1302.

著者寸描

●矢木 真穂 (やぎ まほ)



名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師。博士(薬学)。

■略歴 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。日本学術振興会特別研究員、英国ケンブリッジ大学博士研究員、自然科学研究機構分子科学研究所助教、生命創成探究センター助教などを経て、2022年より現職。

■研究テーマと抱負 アミロイド形成の

分子科学。

■ウェブサイト <http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/sbk/index.html>

■趣味 お取り寄せグルメ。

●加藤 晃一 (かとう こういち)



自然科学研究機構生命創成探究センター 教授。薬学博士。

■略歴 東京大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。東京大学大学院薬学系研究科助手、講師を経て2000年より名古屋市立大学大学院薬学研究科教授。08年より自然科学研究機構分子科学研究所教授、18年より現職。

■研究テーマと抱負 生命分子システムの

動的秩序形成と高次機能発現の仕組みの探究。

■ウェブサイト <https://kato-group.ims.ac.jp/>

■趣味 これから開拓(と、いつも思っています)。