

論文内容の要旨

論文題目

Omics-based study of mitochondrial proteins related to anhydrobiosis in a tardigrade,

Ramazzottius varieornatus.

(網羅的手法を用いたクマムシミトコンドリアの乾燥耐性に関わるタンパク質の研究)

氏名 田中 冨

生命にとって水は必要不可欠である。水の喪失はタンパク質や脂質膜の構造変化を引き起こし、代謝活動の停止や細胞死の誘導を経て、生物個体に死をもたらす。一方で、クマムシをはじめとする乾燥耐性生物は細胞内の水分量を数%以下まで低下させた状態で乾燥に耐えることができる。細胞内の各細胞内小器官も同様に脱水に対する耐性をもつと考えられ、特に、細胞死の制御やエネルギー産生に関わるミトコンドリアを保護することは、クマムシ個体が乾燥耐性を可能にするためには極めて重要と考えられる。

多くの乾燥耐性動物においては乾燥に伴い、トレハロースなどの糖類や、熱による構造の不可逆変化が起きない熱可溶性の LEA (Late embryogenesis abundant) タンパク質が蓄積することが報告されているが、クマムシにおいてはそれらの顕著な蓄積はみられない。当研究室の先行研究において、クマムシの主要な熱可溶性タンパク質は LEA タンパク質ではなく、クマムシに固有の CAHS (Cytoplasmic abundant heat soluble)・SAHS (Secretory abundant heat soluble) タンパク質であることが明らかにされた。しかし、これらタンパク質はそれぞれ細胞質と細胞外に局在しており、ミトコンドリアの保護に関わるタンパク質候補はまったくわかっていなかった。

本研究では、クマムシのミトコンドリアに局在する熱可溶性タンパク質としてクマムシ固

有タンパク質を含む2種類を同定し、これらがヒト培養細胞に高浸透圧耐性を付与することを示した。さらにクマムシのミトコンドリア分画を分離して、ショットガンプロテオミクスによりクマムシのミトコンドリアタンパク質を網羅的に同定した。

1. クマムシミトコンドリアに局在する LEA タンパク質 RvLEAM の同定

乾燥耐性に関わるタンパク質として LEA タンパク質が知られているが、クマムシの LEA タンパク質についてはその実体や性状はまったくわかっていなかった。そこでまず、耐性に関わる候補として、クマムシのトランスクリプトームデータからミトコンドリアへの局在が予測される LEA タンパク質を探索した結果、該当する1つの遺伝子を見出し RvLEAM と名づけた。GFP 融合タンパク質をヒト培養細胞に発現させた結果、ミトコンドリアに局在する性質を持つことが示された。また、クマムシ胚を用いた免疫組織化学的解析においても、実際にミトコンドリアに選択的に局在することが示された(図 1)。さらにリコンビナント RvLEAM タンパク質が熱可溶性をもつことを示し、生化学的にも LEA タンパク質の特徴を保持しており、RvLEAM はクマムシミトコンドリアの耐性に寄与する良い候補と考えられた。

2. クマムシ固有のミトコンドリア熱可溶性タンパク質 MAHS の同定

クマムシは主要な熱可溶性タンパク質として分泌経路と細胞質に局在する2種のクマムシ固有の熱可溶性タンパク質ファミリー CAHS と SAHS を大量に発現している。ミトコンドリアにおいても同様にクマムシ固有な熱可溶性タンパク質が大量に発現している可能性を考え、トランスクリプトームデータを解析した結果、RvLEAM よりも発現量が高くミトコンドリア局在が予測されるクマムシ固有の遺伝子が複数見出された。このうち RvLEAM より2倍以上の発現量を示した6遺伝子について、GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在解析とリコンビナントタンパク質の熱可溶性の検証を行った。その結果、1つのタンパク質がミトコンドリア局在と熱可溶性を示すことを見出し、MAHS (Mitochondrial abundant heat soluble) と名付けた(図 2)。MAHS 相同タンパク質はクマムシ以外の生物には見出されなかったが、クマムシ種間では保存されており、特に保存された領域(MAHS モチーフ)は両親媒性ヘリックスの形成領域と予測された。両親媒性ヘリックスは LEA や CAHS タンパク質でも見出されている構造で、タンパク質の凝集抑制活性を担うことが示唆されている。MAHS モチーフも同様の活性を持つことが推定され、MAHS タンパク質は RvLEAM とともにクマムシミトコンドリアの耐性に関わることが期待された。

3. クマムシの新規ミトコンドリア熱可溶性タンパク質によるヒト培養細胞の高浸透圧耐性の向上

RvLEAM と MAHS の耐性への関与を検証する目的で、ヒト培養細胞に導入した際に水欠乏ストレスへの耐性が向上するかを検証した。比較的穏やかな水欠乏ストレスとして高浸透圧ス

トレスを用いた。RvLEAM と MAHS それぞれを導入したヒト培養細胞を様々な濃度のショ糖添加培地の中で2日間培養し、その後の代謝活性を等張下で測定した。その結果、RvLEAM を発現させた細胞は広いショ糖濃度において、また MAHS を発現させた細胞は、200 mM のショ糖添加濃度において、親株に対して有意に代謝活性が向上した(図 3)。この結果から、RvLEAM、MAHS いずれも水欠乏ストレスへの耐性に寄与しうることが示唆された。

4. ショットガンプロテオミクスを用いたクマムシミトコンドリアタンパク質の網羅的同定

前項において RvLEAM や MAHS が耐性に寄与する可能性が示唆されたが、一方で、これらの他にも耐性に寄与するミトコンドリアタンパク質が存在する可能性が考えられた。ミトコンドリアに局在する新たな耐性候補タンパク質を明らかにするために、クマムシから分離したミトコンドリア分画についてショットガンプロテオミクスによるタンパク質の網羅的な同定を行った。細胞分画の条件を検討し細胞質や小胞体のマーカータンパク質が検出されないミトコンドリア分画を分離した(図 4)。分離したミトコンドリア分画について質量分析を行い、1585 種類のタンパク質を同定した。また、比較対象としてクマムシ全身の破砕液(クマムシ全分画)についても同様の解析を行い 1798 種類のタンパク質を同定した。ミトコンドリア分画においてクマムシ全分画より多くのペプチドが検出されたタンパク質を探索した結果、844 種のタンパク質が見出された。これらミトコンドリア分画に濃縮されたタンパク質は、BLAST 検索を用いた解析から、高い相同性を示すタンパク質が主に後生動物のもの 676 個; 後生動物以外のもの 35 個; 高い相同性を示すタンパク質が見出されない ($e\text{-value} > 1e\text{-}15$) もの 130 個にそれぞれ分類された(図 5)。後生動物以外のタンパク質に主に相同性を示すタンパク質には、水平伝播が示唆されるタンパク質も含まれていた。また、他に相同性を示さないクマムシ固有のタンパク質について、GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在解析を行いミトコンドリアに局在する新規タンパク質を複数見出した。これらはクマムシの耐性を支える有力な候補と考えられる。

まとめと展望

本研究は、乾燥耐性を持つクマムシから2種類の熱可溶性ミトコンドリアタンパク質 RvLEAM と MAHS を同定し、これらがヒト培養細胞の高浸透圧耐性を向上させる活性を持つことを明らかにした。これは他生物に水ストレス耐性を賦与したクマムシタンパク質の初めての例であるとともに、クマムシがミトコンドリアを含めて少なくとも3種の細胞内局在の異なる固有の熱可溶性タンパク質を持つことを明らかにした。さらに、ショットガンプロテオミクスによりクマムシのミトコンドリアタンパク質を網羅的に同定し、クマムシのミトコンドリアがクマムシ固有のタンパク質や後生動物以外のタンパク質に高い相同性を示すタンパク質を多く含むことを明らかにした。本研究で同定したこれらタンパク質は乾

乾燥耐性機構を担う良い候補と考えられ、クマムシのミトコンドリアが獲得した耐性メカニズムの解明につながる事が期待される。

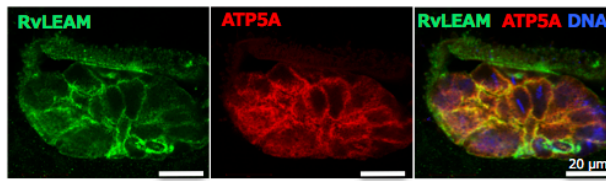


図1 RvLEAM タンパク質のミトコンドリア局在 クマムシ胚の切片における免疫組織化学像。RvLEAM(緑)、ミトコンドリアマーカーATP5A(赤)、DNA(青)。

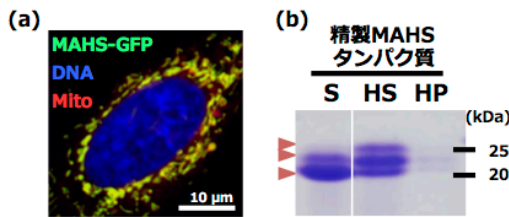


図2 MAHS タンパク質のミトコンドリア局在と熱可溶性性 (a)ヒト培養細胞における GFP 融合タンパク質の細胞内局在。ミトコンドリア(赤)、DNA(青) (b) MAHS タンパク質を大腸菌に発現させ、熱可溶性アッセイを行った。MAHS は熱処理後可溶性画分(HS)に回収された。S:熱処理前可溶性画分、HP:熱処理後沈殿

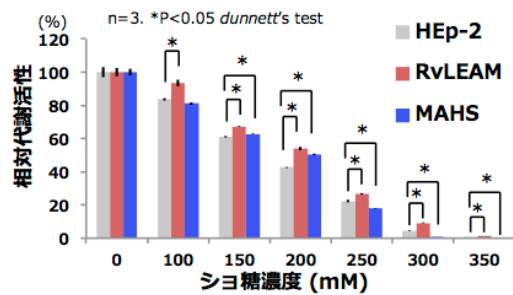


図3 RvLEAM および MAHS による高浸透圧耐性の向上

シヨ糖(0-350 mM)を含む培地中で 2 日間培養し、代謝活性に与える各遺伝子の影響を解析した。

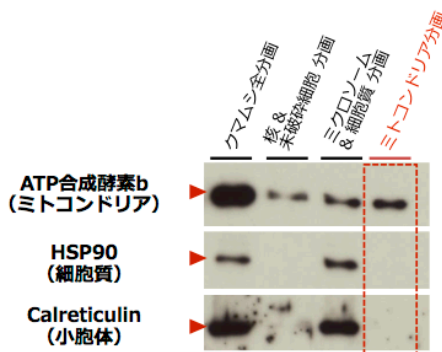


図4 各細胞内分画に対する細胞内局在マーカー抗体を用いたウェスタンブロット解析

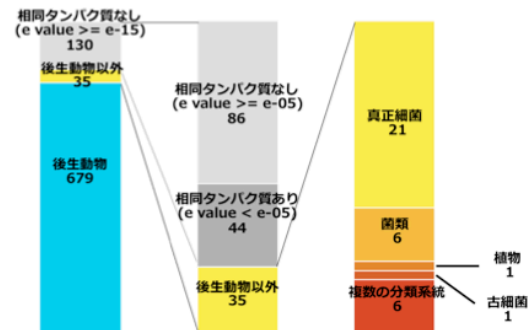


図5 ミトコンドリア分画に濃縮されたタンパク質について相同性を示すタンパク質の系統分類に基づく分類 BLAST 検索で上位 100 位に含まれるタンパク質について 50%以上を占める生物分類群に基づいて同定したクマムシのタンパク質を分類した。