

# 論文審査の結果の要旨

氏名 田 中 冨

クマムシは、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。多くの乾燥耐性動物では乾燥に伴ってトレハロースなどの糖類や、熱変成が起きない熱可溶性の LEA (Late embryogenesis abundant) タンパク質が蓄積するが、クマムシではそれら分子の顕著な蓄積は見られない。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、クマムシ固有な CAHS (Cytoplasmic abundant heat soluble) と SAHS (Secretory abundant heat soluble) タンパク質であることが報告された。クマムシでは細胞本体に加えて、細胞内の各細胞小器官も同様に乾燥耐性をもつと期待され、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の保護は、クマムシ個体が乾燥耐性を獲得する上で重要と考えられる。しかしながら、クマムシのミトコンドリアの乾燥耐性に関わるタンパク質は全く不明であった。論文提出者は本研究において、クマムシのミトコンドリア局在性の新規熱可溶性タンパク質を同定し、これをヒト培養細胞に導入することで、高浸透圧耐性が賦与されることを示した。またショットガンプロテオミクスによりクマムシ固有なミトコンドリアタンパク質を網羅的に同定した。

本論文は 2 章からなる。第 1 章では、クマムシミトコンドリアの乾燥耐性に関わる候補分子として、ミトコンドリア局在性の LEA タンパク質を探索し、RvLEAM を見出した。GFP 融合 RvLEAM タンパク質をヒト培養細胞に発現させるとミトコンドリアに局在し、クマムシ胚を用いた免疫組織化学でもミトコンドリア選択的な局在が示された。次にミトコンドリアにも発現量が高く、クマムシ固有な熱可溶性タンパク質が存在する可能性を考え、トランスクリプトームデータを解析した結果、複数の候補遺伝子を見出した。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実験の結果、MAHS (Mitochondrial abundant heat soluble) と命名したクマムシ固有なタンパク質を見いだした。

上記 2 種類のタンパク質を導入・発現したヒト培養細胞を、比較的穏やかな

水欠乏ストレスとして、蔗糖を添加した培地の中で 2 日間培養し、代謝活性を測定したところ、RvLEAM 発現細胞は広い蔗糖濃度で、また MAHS 発現細胞は、200 mM の蔗糖濃度で有意に高い代謝活性を示した。この結果から、RvLEAM と MAHS が水欠乏ストレスへの耐性に寄与していることが示された。

上述のタンパク質以外にもミトコンドリアの乾燥耐性に寄与するタンパク質が存在する可能性を考え、第 2 章ではクマムシのミトコンドリア分画を調製し、ショットガンプロテオミクスを用いて網羅的同定を行った。その結果、ミトコンドリア分画から 1585 種類のタンパク質を同定した。同様にクマムシ全身の破碎液から同定された 1798 種類のタンパク質と比較した結果、844 個がミトコンドリア分画に濃縮されていることが分かった。さらに BLAST 検索の結果、後生動物以外の生物のタンパク質と相同性を示すものを 35 個、クマムシ固有タンパク質を 130 個見いだした。前者からは、真菌類から水平伝播したと推察されるタンパク質が見いだされた。後者について、GFP 融合タンパク質を用いて細胞内局在を解析した結果、複数のミトコンドリア局在性の新規タンパク質を同定した。これらはクマムシの乾燥耐性を支える有力な候補分子である。

以上、本研究は、乾燥耐性生物であるクマムシから、クマムシ固有な、ミトコンドリア局在性の熱可溶性タンパク質を見だし、これらをヒト培養細胞に発現することで、高浸透圧耐性が向上することを示した。またプロテオミクスを用いてクマムシミトコンドリアが固有なタンパク質を多数含むことを示した。これらは極限環境生物学分野の先駆的で独自性の高い研究成果である。加えてクマムシ細胞は細胞外・細胞質・ミトコンドリアというコンパートメントに、異なる熱可溶性タンパク質を配備していることを示した点で、細胞生物学的にも興味深い。本研究で同定したタンパク質群はクマムシの乾燥耐性機構を担う良い候補と考えられ、その分子機構の解明に貢献すると期待される。

なお、本論文は、田中順子・三輪佳宏（以上、筑波大学）、堀川大樹・荒川和晴（以上、慶応大学）・片山俊明（DBCLS）・豊田敦（遺伝学研究所）、尾山大明・秦裕子・國枝武和・久保健雄（以上、東京大学）との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。