

# 研究終了報告書

## 「クマムシの乾眠機構にせまる多階層横断構造生物学」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：福田 庸太

### 1. 研究のねらい

クマムシは体長1 mm以下の動物で、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——いわば無生物のような状態——になることで乾燥に耐えられる。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、宇宙空間のような高放射線量環境下でも生存できる。そんな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。この驚異的な乾眠機構の研究は、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協同的な働きによって乾眠を可能にしていると考えられているが、ゲノム情報はクマムシタンパク質の多くがアミノ酸配列レベルで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 ACT-X 研究者は、自身のバックグラウンドである構造生物学や生化学といった原子・分子レベルの解析から、クマムシ固有タンパク質がこれまでの常識を覆しうるものに満ち溢れており、個体レベルで見ても興味深いクマムシは、原子・分子レベルで見ても面白い、との考えを深めてきたが、同時に、原子・分子レベルの知見をいくら蓄積しようとも、それらを細胞レベル、さらには個体レベルの知見と結びつけなければ、構造生物学に立脚した乾眠機構の解明にはとうてい及ばない、というもどかしい思いも強まり、より大きなスケールでの乾眠にともなう構造生物学的知見を集める必要性を感じ始めた。本研究の当初の狙いはしたがって、原子・分子レベルの研究を継続・発展させてさらなる知見を蓄積することに加え、その上の階層におけるクマムシ構造生物学の基盤となる技術をも確立することである。とくに、超分子レベル、細胞・オルガネラレベルでの細胞内構造を直接的に3次元可視化のため、電子顕微鏡技術を用いてクマムシの細胞内を高分解能で観察することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

原子・分子階層の構造研究で進展があり、クマムシの乾眠に迫るための重要な知見がさまざま得られた。いっぽう、細胞階層でのクマムシ生体構造の可視化については未だ達成できていないが、その基盤となる予備的な検討を行うことができた。ACT-X 申請時点では、クマムシは極めて特殊な生物であり、その特殊性の謎を解くことが最重要課題であると考えていたが、原子・分子階層の ACT-X 研究を通じてクマムシが特殊性とともに普遍性も予想以上に示すことが見えてきた。具体的には以下の3点が明らかになった。1) アミノ酸配列が既知タンパク質と異なっても、立体構造上は既知タンパク質と酷似したクマムシ固有タンパク質がおそらくは多数存在する。2) 他の生物と共通した普遍的な耐性機構を有している可能性がある。3) 高活性を持つ魅力的なタンパク質も存在する。1)については、既知タンパク



質との配列類似性を示さなかった”クマムシ固有”タンパク質についての X 線結晶構造解析をおこなった結果、既知フォールドを有していることが判明し、構造的特徴から既知タンパク質と同様の機能を担っていることが示唆されるなどした。配列類似性がない反面、立体構造とそれに付随する機能は既知タンパク質と酷似しているというのは、過去に構造決定された SAHS タンパク質というクマムシ固有分子でも観察されていたことであるが、本研究でのデータ蓄積により、アミノ酸配列からはクマムシ固有の変わりものと目されていたタンパク質がしばしば普遍的な構造・機能を持つタンパク質であることが確からしくなってきた。2)については他の生物にも存在するものの、これまで注目されていなかったタンパク質もクマムシの耐性に寄与しているであろうことが示された。一方でクマムシ由来タンパク質では、活性中心付近の構造が異なることが示唆されるといったクマムシならではの特殊性も明らかになった。3)については、「よく知られたタンパク質にもかかわらず、既知のものと同様の構造を持つクマムシタンパク質」の存在がいくつも明らかになった。これらの特殊な高活性クマムシタンパク質は、まだまだクマムシゲノムの中から見出され、生物化学分野での新たなツールとしての応用も期待できると考えている。細胞階層でのクマムシ生体構造の可視化については、クマムシを飼育し、電子顕微鏡観察のための加工に適したサイズのサンプルを準備した。化学固定を行うと生体構造に少なからぬ影響があるため、化学固定は行わずにグリッド上で乾燥させたクマムシを観察に適した状態に成形する手法を採用した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1 原子・分子階層での構造生物学

概要で述べた「クマムシが特殊性とともに普遍性も予想以上に示すことが見えてきたこと」について詳細を以下に述べる。

1) アミノ酸配列が既知タンパク質と異なっても、立体構造上は既知タンパク質と酷似したクマムシ固有タンパク質が(ひょっとすると多数)存在する。乾燥時に高発現し、既知タンパク質との配列類似性を全く示さなかったクマムシ固有タンパク質について X 線結晶構造解析をおこなった結果、ヒトを含む多くの生物が有する C2 ドメインという既知フォールドを有していることが判明し(図 1)、クマムシ固有 C2 ドメインタンパク質(Tardigrade C2 domain Protein: TC2P)と名付けた(「5. 主な研究成果リスト」成果論文 1)。TC2P は既知の C2 ドメインタンパク質と同様に、複数の Ca<sup>2+</sup>イオンを捕捉できることも明らかになったため、Ca<sup>2+</sup>イオンの運搬・貯蔵、また乾燥時におけるシグナル伝達といった機能を担っていることが示唆された。その他にも、やはり乾燥時に高発現し既知タンパク質と配列類似性のない別のクマムシタンパク質について AlphaFold2 による構造予測を行うと、構造既知のリポカリンファミリータンパク質と酷似していた。本タンパク質については既に結晶が得られており、構造解析を実施する予定である。このような、配列類似性がない反面、立体構造とそれに付随する機能は既知タンパク質と酷似しているというのは、過去に本 ACT-X 研究者によって世界で初めて構造決定されたクマムシタンパク質である分泌型熱可溶性(SAHS)タンパク質というクマムシ固有の分子でも観察されていたことである。本研究でのデータ蓄積により、ゲノム解析のみからはクマムシ固有の変わりものと目されていたタンパク質が、しばしば普遍的な構造・機能を持つタンパク質であるということが、初めて確からしくなってきた。

2) 他の生物と共通した普遍的な耐性機構を有している可能性がある。他の生物にも存在す

る(が、これまで注目されていなかった)タンパク質もクマムシの耐性に寄与しているであろうことが、クマムシが有するタンパク質の研究から示され始めている。構造解析と生化学的解析から本タンパク質が既知のタンパク質とは異なる活性中心構造を持つことが明らかになった。本タンパク質は既知のタンパク質との配列相同性を示さないいっぽうで、多様なドメイン界の生物にホモログが見つかる。とりわけ興味深いことに、本タンパク質を有する生物は、細菌であれば乾燥環境から見つけ放射線耐性を持つ細菌や、高塩濃度環境に適応した好塩菌が多く、動物であればクマムシ同様に乾眠能を持つワムシなどであり、植物であれば乾燥を克服し地球史上はじめて陸上へ進出した基部植物であるコケ植物やシダ植物である。これらの事実は本タンパク質と浸透圧ストレス耐性との関連を窺わせる。

3) 高活性を持つ魅力的なタンパク質も存在する。1), 2)で述べたクマムシが持つ「一見未知のものだが実は普遍性を持つタンパク質」とは対照的に、「よく知られたタンパク質にもかかわらず、既知のものと同様を画すクマムシタンパク質」の存在が明らかになった(図 3)。例えば、多種多様な生物が有しており、様々な研究がなされてきたヘムタンパク質についてである。ヨコヅナクマムシのシトクロム b5 は構造解析の結果、全体構造や分光学的性質は既知のシトクロム b5 とよく似ているが、表面電荷分布が特徴的で、クマムシ固有の電子伝達経路の存在が示唆された(成果論文 3)。クマムシのグロビタンパク質 Kgb は既知のグロビタンパク質と似たフォールドを持つが、詳細な生化学解析を行ったところ、本タンパク質が既知のいかなるグロビタンパク質よりも文字通り桁違いに速く酸素を還元できること、-400 mV という異常に負に大きい酸化還元電位を示すなどが明らかになっている(成果論文 3)。また、生物に幅広く存在する酵素であり、乾燥時のヨコヅナクマムシ内で最も高発現しているある酵素の活性測定をおこなったところ、一般的な同酵素より数十倍活性の高いことが明らかになった。また、その高活性の理由となるアミノ酸残基を X 線結晶構造解析から推定することができた。

#### 研究テーマ 2 細胞階層での構造生物学

クマムシ細胞内の直接観察に向けたクライオ電子トモグラフィーのための基礎技術開発をおこなった。当初計画に入っていた連続断面観察解析については海外のグループによって類似研究が進行中であったため、本研究ではクライオ電子トモグラフィーの遂行に集中した。以下に詳細を記す。

クマムシ細胞内をクライオ電子トモグラフィーで高分解能観察するためには、トモグラフィー像を多数重ね合わせるサブトモグラムと呼ばれる手法を利用することが普通であるため、なるべく多くの均一なサンプルが必要となる。そこで、クマムシを飼育することを考え、乾燥耐性を持つクマムシの中でもとりわけ耐性能が高いヨコヅナクマムシの飼育を開始した。この結果、卵・幼体・成体といった様々なライフステージのサンプルが再現よく得られるようになっただけでなく、生体から mRNA 抽出などでもできるようになり、構造生物学的研究を相補的に支えることのできる種々のオミクス解析も可能な環境が構築できた。実際に現在、予備的ではあるが、特定の機能を持つクマムシタンパク質を見出すためのプロテオミクス研究を進行中である。

クマムシは周囲の水分量の低下を敏感に察知し、急速な脱水を行う。このため活動状態のサンプルを用いると、試料調製中の細胞内水和度の厳密なコントロールが難しく、どういった

状態を観察しているのかを把握しにくいと思われた。そこでまずは完全な乾燥状態のクマムシ細胞内を観察することを目指した。化学固定用の溶液の浸潤や樹脂包埋時の作業により乾燥状態のクマムシに形態変化が生じるため、完全な乾燥状態の細胞内構造を「生のまま」保ったままで捉えるために、化学固定等はおこなわず、直接(体積の小さい)幼体や卵を乾燥させ、これをそのまま観察サンプルとする手法を適用した。グリッド上で加工や観察に適した位置でクマムシが乾燥してくれるかどうかは運任せにならざるを得ず、多数のクマムシ個体がサンプル準備に必須であることも判明した。この点もクマムシの飼育によって解決できた。サンプルを極低温に保てるクライオステージと走査型電子顕微鏡を搭載した FIB 装置を用い、グリッド上のクマムシを薄く加工できることを確かめた。現在は、加工したクマムシを用いて透過型電子顕微鏡での観察実験を進行中である。

### 3. 今後の展開

ACT-X 研究では、必要な装置群にアクセスできなかったために、細胞階層でのクマムシ内生体構造の可視化を達成できなかったが、現在では使用可能な装置のめどが立ち、研究を遂行中である。細胞階層での研究は今まさに軌道に乗り始めており、単粒子解析を通じクライオ電子顕微鏡についての知識と経験を積むことができたことも考えると、今後の細胞階層でのクマムシ内生体構造の可視化は遂行可能であると考えている。Cryo-ET は、扱い方が確立している細菌や培養細胞、筋組織をサンプルとして用いたものでさえ、いまだ世界的にも実施例の限られた手法である。クマムシを用いたクライオ電子トモグラフィーを達成できれば、これまで以上に本手法の有用性や応用範囲の広さを示すものとなるであろう。

いっぽう ACT-X 研究での原子・分子の視点からは、クマムシが特殊性とともに普遍性をも予想以上に示すことが見えてきた。普遍性という点を考慮すれば、クマムシのみに目を向けているとその特殊性を強調しすぎるあまり、耐性機構に迫り切れない可能性が示唆される。クマムシの乾燥耐性を俯瞰的視点から生物学上に位置付けなおす意味でも、乾燥耐性を持つ未開拓生物について研究を進展させていく必要性を感じている。具体的には、かつてのクマムシ同様、分子から細胞といった本 ACT-X 研究者の射程とする階層の研究がなされていない未開拓生物について、遺伝子発現を網羅的に解析するとともに、固有遺伝子がある場合は組み換えタンパク質として発現させ、立体構造を原子レベルで明らかにする。いっぽうで、同定される遺伝子が生物に普遍的に存在するタンパク質であっても、発現量が有意に高い場合やそのアミノ酸配列に変わったところが見つかれば、活性測定を行うなど分子階層での研究を実施する。この過程において ACT-X 研究でクマムシから見つかったような予期せぬ高活性タンパク質が新たに見つかるかもしれない。乾燥耐性に関する普遍的な視点が現れてくるかもしれない。

### 4. 自己評価

先述のように細胞階層でのクマムシ内生体構造の可視化を期間内に達成できなかった点については忸怩たる思いでいる。しかしこれまでに挑戦したことのない手法を行うために実施したい研究内容について多くの研究者と交渉を行うという経験ができた。本研究を通じてクマムシの研究をしていることが周囲に認知され始め、クマムシタンパク質の創薬応用への共同研究が始まったことに鑑みても、研究者としての「個」を確立できつつあるのではないかと考えている。さら

に本研究で原子・分子の視点からは、クマムシが特殊性とともに普遍性をも予想以上に示すことが見えてきた。クマムシが特殊性のみならず普遍性を予想以上に備えているというのはこれまでの「クマムシは特殊であるという」一般社会にも流布した思い込みを覆しうるものである。すなわち乾眠研究を一般的な生命現象の枠組みで説明可能であるという新たな視点を与えるものであり、社会的にも影響のある研究の基盤を一定程度築くことができたと考えている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. **Yohta Fukuda**, Tsuyoshi Inoue. “Structural insights into a C2 domain protein specifically found in tardigrades” *Protein Science*. 2021. **30(2)**: 513–518.

乾燥時に高発現し、アミノ酸配列上クマムシに固有と思われたタンパク質の構造解析をおこなったところ、既知の C2ドメインタンパク質と同じフォールド(Dali server Z score > 10)を持ち、C2ドメインタンパク質と同様に複数の Ca<sup>2+</sup>イオンと結合できることを明らかにした。

2. **Yohta Fukuda**, JeeEun Kim, Tsuyoshi Inoue. “Structure of cytochrome *b*<sub>5</sub> unique to tardigrades” *Protein Science*. 2020. **29(8)**: 1829–1835.

アミノ酸配列上クマムシに固有と思われたシトクロム *b*<sub>5</sub> の構造解析と分光学的キャラクターゼーションをおこなった。分光学的性質及び全体構造は既知のシトクロム *b*<sub>5</sub> と同様であったが、表面電荷分布が全く異なっており、クマムシに特有な電子伝達経路の存在することが示唆された。

3. Kazuo Kobayashi, JeeEun Kim, **Yohta Fukuda**, Takahiro Kozawa, Tsuyoshi Inoue “Fast autooxidation of a bis-histidyl-ligated globin from the anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*, by molecular oxygen” *The Journal of Biochemistry*. 2021. **169(6)**: 663–673.

ヨコヅナクマムシが有するグロビタンパク質である Kumuglobin (Kgb) の酸素分子との極めて速い化学反応過程についてパルスラジオリシス法を用いて詳細な解析をおこなった。Kgb は既知のどのグロビタンパク質よりも速く酸素を還元できることが判明した。また Kgb は極めて負に大きな酸化還元電位を持つこともわかった。

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

報道 「地上最強生物」クマムシ 驚異的な能力の秘密とは? 2020年3月20日 朝日新聞