

2022年9月7日

クマムシ耐性タンパク質によるストレスに応答した細胞の硬化 —究極生命体に向けて・カーズ(CAHS)タンパク質の働き—

1. 発表者：

田中 彬寛（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 博士課程）
中野 智美（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 修士課程（研究当時））
尾山 大明（東京大学医科学研究所附属疾患プロテオミクスラボラトリー 准教授）
柳澤 実穂（東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 准教授）
國枝 武和（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 准教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ 乾燥耐性に関わるクマムシ固有のカーズ（CAHS）タンパク質が脱水様ストレスに応答して動物細胞内で可逆的に繊維構造を形成するとともに細胞を硬化させ、細胞のストレス耐性を向上させることを明らかにしました。
- ◆ カーズ（CAHS）タンパク質が細胞内に柱のような構造を形成することで物理的安定性を高めて細胞の耐性に寄与するという新たな耐性メカニズムを提唱しました。
- ◆ 耐性の新規メカニズムを提唱する成果であり、同様のメカニズムによる新規耐性タンパク質の発見や改良、人工耐性分子の新規設計などに寄与することが期待されます。

3. 発表概要：

水は生命に必須の構成成分ですが、クマムシ（注 1）など一部の動物はほぼ完全な水の喪失に耐える特殊な能力を持ちます。これまでに耐性に関わるクマムシ固有のタンパク質がいくつか同定されてきましたが、その分子メカニズムの詳細は不明でした。

東京大学大学院理学系研究科の田中彬寛大学院生・中野智美大学院生（研究当時）・國枝武和准教授らのグループは、大学院総合文化研究科の柳澤実穂准教授、医科学研究所の尾山大明准教授らのグループと共同で、脱水様ストレスに応答して可逆的に集合するタンパク質群をクマムシから網羅的に同定し、その中にクマムシ固有の耐性タンパク質カーズ（CAHS）が含まれることを見出しました。さらに、CAHS タンパク質がゆるやかな脱水をもたらす高浸透圧ストレスに応答して細胞内で可逆的に繊維を形成し、細胞の機械的な強度および高浸透圧ストレス耐性を向上させることを明らかにしました。耐性タンパク質が環境ストレスに応答してダイナミックに高次構造体を形成することで、オンデマンドに細胞に機械的な安定性を付与するという新たな耐性メカニズムを提唱しました。今回の新規な乾燥耐性メカニズムの解明は、貴重な生体サンプルやバイオ医薬などの新たな乾燥保存技術の開発につながることを期待されます。

4. 発表内容：

クマムシはほぼ完全な乾燥に耐える特殊な能力をもち、乾燥状態でさまざまな極限環境に耐性を示します（図 1）。近年、クマムシの分子生物学的な解析が急速に進み、耐性に関わる因子としてクマムシ類だけが持つ固有のタンパク質群が見いだされてきました。その多くは特定の立体構造をとらない非構造的なタンパク質で、どのようにして耐性に寄与するのかそのメカニズムはほとんど分かっていませんでした。最近このような非構造的なタンパク質は互いに緩や

かに結合して可逆的な集合体を形成する液-液相分離（注 2）という現象を示すことが見いだされ注目を集めています。

研究グループは、クマムシの非構造性の耐性タンパク質の中に、脱水ストレスに応答して可逆的に集合体を形成するものがあるのではないかと予想しました（図 1）。そこで、クマムシの破碎液から脱水様のストレスに応答して可逆的に集合するタンパク質群を網羅的に分離する手法を新たに確立し、336 種のタンパク質を同定することに成功しました。これらの中には既に耐性への関与が指摘されながらそのメカニズムが不明であったカーズ（CAHS）タンパク質群が含まれていました。

研究グループは大量に含まれていた CAHS タンパク質の一部（CAHS3 および CAHS12）に着目し、細胞内の挙動を解析するために緑色蛍光タンパク質（GFP）（注 3）を融合してヒト培養細胞に導入しました。すると非ストレス条件下では細胞内に一様に分散しましたが、緩やかな脱水をひきおこす高浸透圧ストレスに細胞を曝露すると CAHS タンパク質がダイナミックに集合して多数の繊維状の構造を形成する様子が観察されました（図 2、動画 1）。この繊維構造の形成は可逆的で、高浸透圧ストレスを除くと CAHS タンパク質は再び細胞内に分散した状態に戻りました（動画 2）。

研究グループはさらに CAHS タンパク質の繊維形成がもたらす物性への影響を調べるために、CAHS3-GFP タンパク質を含む細胞サイズの微小な液滴を作成し、その固さ（弾性率）（注 4）を計測しました。すると、繊維化を誘導しない条件では弾性は認められず液体状であったのに対し、繊維構造を形成する条件では顕著に弾性化（硬化）が検出されました。動物細胞への影響を調べるために、CAHS3 タンパク質を発現する昆虫培養細胞株を作出し、繊維化の誘導前後で物性を解析しました。繊維化を誘導しない条件では、CAHS3 発現細胞とコントロール細胞で細胞表面の固さ（弾性率）に顕著な違いはありませんでしたが、繊維化を誘導する高浸透圧条件下では CAHS3 発現細胞がコントロール細胞よりも有意に細胞の硬さ（弾性率）が上昇していました。高浸透圧ストレスに曝露された細胞では浸透圧による水の流出によって細胞が圧縮され体積が減少しますが、CAHS3 発現細胞ではこの体積の減少も抑制されていました。さらに CAHS3 発現細胞は高浸透圧ストレス曝露後の生存率もコントロール細胞に比べて有意に向上していることが明らかになりました。以上の結果から、CAHS タンパク質は細胞を物理的に強化し、高浸透圧耐性を向上させることがわかりました。

本研究によって、CAHS タンパク質はストレスがある時にだけ、繊維構造を形成し細胞に機械的な抵抗性を付与することが明らかになりました。ストレスのない環境では CAHS タンパク質は通常生命活動を阻害しないように細胞内に分散し、脱水ストレス下では細胞内に繊維構造を形成し機械的な強度を高めることで細胞を保護していると考えられます（図 3）。

今回明らかにされた CAHS タンパク質の新規耐性メカニズムをもとに、新規耐性タンパク質の発見や改良、人工耐性分子の設計などを介して、将来的には貴重な生体サンプルやバイオ医薬などの新たな乾燥保存技術の開発につながることを期待されます。

本研究は、日本学術振興会 科学研究費助成事業（課題番号：JP18H04969、JP20H04332、JP20K20580、JP21H05279、國枝武和；JP21H05871、柳澤実穂）、日本学術振興会特別研究員奨励費（課題番号：JP21J11385、田中彬寛）などの支援を受けて行われました。

本研究の主な構成員：

田中 彬寛（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 博士課程）

中野 智美（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 修士課程（研究当時））

渡邊 健斗（東京大学理学部生物学科 4 年生（研究当時））
増田 和俊（東京大学教養学部統合自然科学科 3 年生）
本田 玄（東京大学大学院総合文化研究科附属先進科学研究機構 特任助教）
秦 裕子（東京大学医科学研究所附属疾患プロテオミクスラボラトリー 技術専門員）
尾山 大明（東京大学医科学研究所附属疾患プロテオミクスラボラトリー 准教授）
柳澤 実穂（東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 准教授）
國枝 武和（東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 准教授）

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*PLOS Biology*」

論文タイトル：Stress-dependent cell-stiffening by tardigrade tolerance proteins that reversibly form a filamentous network and gel

著者：Akihiro Tanaka, Tomomi Nakano, Kento Watanabe, Kazutoshi Masuda, Gen Honda, Shuichi Kamata, Reitaro Yasui, Hiroko Kozuka-Hata, Chiho Watanabe, Takumi Chinen, Daiju Kitagawa, Satoshi Sawai, Masaaki Oyama, Miho Yanagisawa, Takekazu Kunieda*

DOI 番号：10.1371/journal.pbio.3001780

アブストラクト URL：

<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3001780>

6. 問い合わせ先：

（研究に関すること）

東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻

准教授 國枝 武和（くにえだ たけかず）

https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/people/kunieda_takekazu/

（報道に関すること）

東京大学大学院理学系研究科・理学部 広報室

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/>

7. 用語解説：

（注 1）クマムシ

おおむね体長 1 mm 以下の 8 本脚をもつ微小な水棲動物群で、分類学における緩歩動物門に属する動物の総称。海底や湖沼だけでなく乾燥しやすい陸上環境にも生息し、陸上種の多くは乾燥耐性を持ち、乾燥した状態では高温や超低温、超高压などの極限的な環境にも耐えることで知られています。今回実験に使用したヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) は、札幌で発見された高い乾燥耐性をもつ種で、ゲノム解析をはじめさまざまな分子生物学的な解析に利用されています。

（注 2）液-液相分離

ドレッシングの水と油のように、2 種類の液体が交じり合わず 2 層に分かれる現象です。物理学や化学分野では昔から知られた現象でしたが、生物学分野においては近年急速に注目され、

細胞内の特定の生体分子が液-液相分離することでさまざまな生命活動に重要な役割を果たしていることが明らかになってきています。

(注3) 緑色蛍光タンパク質 (GFP)

緑色の蛍光を発するタンパク質で下村脩博士らによってオワンクラゲから発見され、ノーベル化学賞の受賞につながりました。本研究では CAHS タンパク質の細胞内での位置を調べるために、GFP と CAHS タンパク質をつないだ融合タンパク質を用いました。

(注4) 固さ (弾性率)

弾性率とは、ある物質の変形のしにくさを表す値で、変形させるのに必要な力とその変形量との比率で示されます。本研究では固さの指標として弾性率を計測し比較を行いました。

8. 添付資料 :

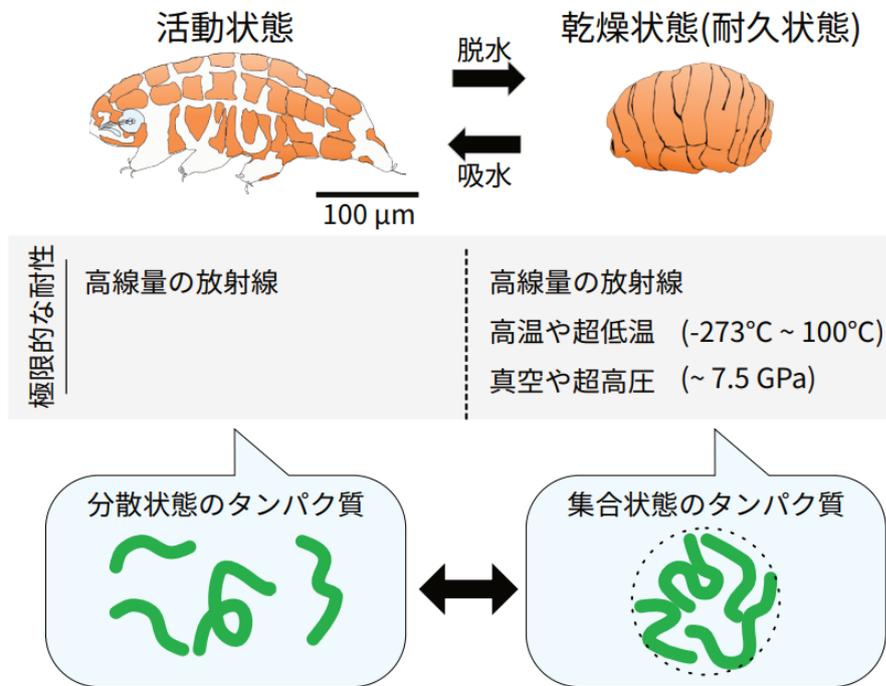


図1: クマムシのストレス耐性能力とストレス時にのみ集合するタンパク質のモデル
 本研究で新たに確立された手法を用いて、ストレスにตอบสนองして可逆的に集合するクマムシタンパク質が 336 種類同定された。

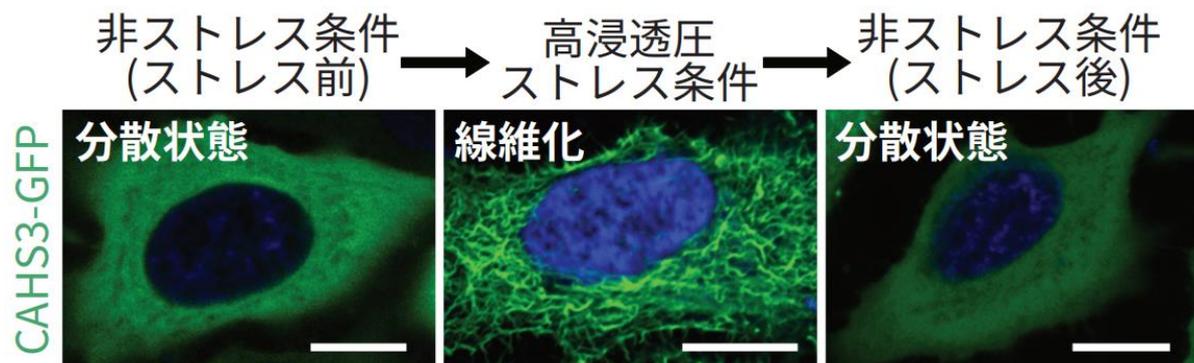


図 2：ヒト培養細胞内におけるカーズ（CAHS）3-GFP タンパク質の高浸透圧ストレスに応答した可逆的な繊維構造の形成

動画 1：カーズタンパク質（CAHS3-GFP）がヒト培養細胞内で高浸透圧曝露依存に繊維構造を形成する様子

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/kuma/movies/mov1.html>

動画 2：高浸透圧ストレスの除去によってカーズタンパク質（CAHS3-GFP）の繊維構造が崩壊する様子

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/kuma/movies/mov2.html>

本研究から予想されるCAHSタンパク質が細胞を保護する仕組み

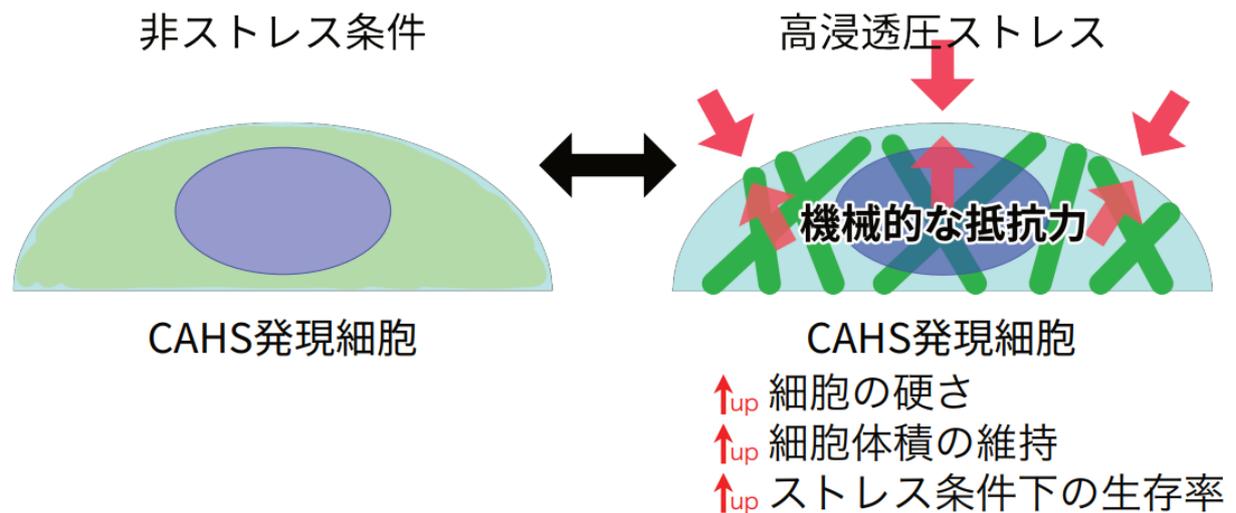


図 3：クマムシ固有のカーズ（CAHS）タンパク質によるストレス依存の繊維化・細胞硬化と耐性向上のモデル