

# ヨコズナクマムシの乾眠に関わるタンパク質の分析を目指して

Aiming to analyze the protein involved in dehydrated state of *Ramazzottius varieornatus*

## Abstract

Water bear with 3% water in its body goes into a state of dry sleep and has been shown to tolerate a variety of extreme environments. In this study, we will examine the expression level of GAPDH, one of the proteins that are universally expressed in eukaryotic cells, as a comparison to investigate the proteins involved in tardigrade dry sleep.

## 1. はじめに

緩歩動物門に属するクマムシは、体内の水分量が3%になると乾眠状態と呼ばれる仮死状態に移行し、様々な極限状態に耐性を示すことが知られている。例えば宇宙放射線への耐性や水分を与えると代謝を再開する性質は、将来的に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ている。先行研究では、乾眠と蘇生を繰り返すことで蘇生率は低下することや、乾燥耐性に関わるクマムシ固有のCAHSタンパク質が脱水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が明らかになっている。

そこで我々は、CAHSタンパク質の量の変化がクマムシ蘇生率に何らかの影響を与えると仮説を立て、CAHSタンパク質を定量することを目標とした。

まず初めに比較対象として、真核生物の中で普遍的に発現しているGAPDHタンパク質がクマムシ体内に発現しているか確認するため実験を行った。

## 2. 方法

### 2.1 実験① 学校でのクマムシの採取

私たちは始めにクマムシを採取し、飼育することを試みた。主に学校や班員の自宅付近に生えている苔からクマムシを採取した。クマムシを採取する方法としては、採取した苔をシャーレに入れ、そこに水を入れ15~20分放置した。そして、顕微鏡で苔の中にあるクマムシを探すという方法を行った。また、私たちはクマムシを採取した後にシャーレの中で飼育することを試みた。

### 2.2 実験② ヨコズナクマムシの飼育

科学のもりの中間発表会にて大阪大学薬学部の井上先生からお声掛けをいただき、同じく大阪大学薬学部の福田先生からヨコズナクマムシを提供していただけることになった。直接ヨコズナクマムシの最適な飼育方法や飼育環境、私たちが行っていきたい実験などについてアドバイスをいただいた。実際に教えていただいたことを基にヨコズナクマムシを飼育した。



図1 ヨコズナクマムシ

- (1) シャーレに1%寒天を厚さ5mm程になるように注ぎ、固める。保存する場合は4℃のインキュベーターに入れておく。
- (2) (1)のシャーレにvolvicを1mm注ぎ、1mlクロレラを加えよく混ぜる。

(3) クマムシを移したシャーレは21°Cのインキュベーターで飼育する。

(4) 5日から一週間に一度クマムシを新しいシャーレに移す。



図2 ヨコズナクマムシの飼育に用いたシャーレ

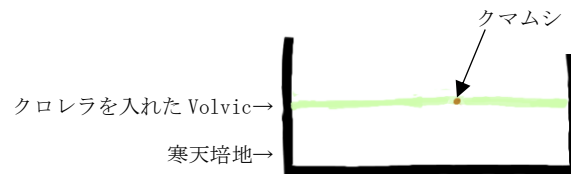


図3 シャーレの図

### 2.3 実験③ クロレラの培養

ヨコズナクマムシを飼育するにあたって餌となるクロレラの培養も試みた。これを行った理由としては、ヨコズナクマムシの餌である「生クロレラ-V12」は大変高価であり、かつクロレラは冷凍したり、乾燥させたりすると死んでしまうため、さらにコストがかかる。そこで、三角フラスコに水にクロレラ、ハイポネックスを入れ、インビトロシェーカーで空気を入れる実験を行った。

### 2.4 実験④ GAPDH 遺伝子の発現の確認

私たちはヨコズナクマムシの乾眠に関わるタンパク質を調べていく前段階として、様々な生物に普遍的に発現しているヨコズナクマムシの GAPDH の発現について調べた。



図4 使用したキット

- I. 室温の状態でヨコズナクマムシを十匹程度採取し、30秒間の遠心分離を行う。
- II. TRI で溶かされたサンプルに同量のエタノール(95-100%)を加える。
- III. 混合物をコレクションチューブと Zymo-Spin™ IC カラムに移し、遠心分離する。遠心分離機にかけたカラムの内容物はコレクションチューブに移し、使ったカラムは破棄する。
- IV. カラムに 400  $\mu$ l RNA ウォッシュバッファーを追加し、遠心分離機にかける
- V. 5  $\mu$ l の DNase I と 35  $\mu$ l DNA Digestion Buffer バッファーを滅菌したチューブに追加し、タッピングにより混合させる。
- VI. 室温(20~30°C)で15分放置する。
- VII. Direct-zol RNA PreWash を 400  $\mu$ l カラムに入れ、遠心分離機にかける。流出した液体を廃棄し、この手順を再度行う。
- VIII. RNA Wash Buffer 700  $\mu$ l をカラムに入れ、洗浄液を完全に除去するために1分間遠心分離機にかける。カラムを滅菌したチューブに移す
- IX. 逆転写酵素を用いて mRNA サンプルを cDNA へと逆転写し cDNA に対して GAPDH 遺伝子を増幅させるために PCR を行う。
- X. GAPDH の DNA が増幅されているかを確認するために電気泳動を行う。

### 3. 結果・考察

#### 3.1 実験①

学校や班員の自宅近くで採取したクマムシの種類は、クマムシの形や色から真クマムシ網の中のオニクマムシやチョウメイムシだと考えられた。しかし、どの個体も飼育が長続きしなかった。原因としては、飼育を行っていた時期の夏の暑い環境にクマムシが弱かったことや、顕微鏡での観察を長時間行いシャーレ内の環境が高温になっていたこと、発見した個体数があまりにも少なかったことが挙げられる。



図5 採取できたクマムシ



図6 右:オニクマムシ 左:チョウメイムシ

引用：[Apotardigradaに関するクマムシの分類学を再分析 - 論文ハイライト - 研究ハイライト - 研究紹介 - 慶應義塾大学先端生命科学研究所 \(keio.ac.jp\)](https://www.keio.ac.jp/research/spotlight/spotlight-01/)

#### 3.2 実験②

ヨコズナクマムシを頂き、卵が産卵され、孵化した様子も観察できたが、動かずに死んだ成体も多かったため、個体数が大きく変化することはなかった。又、飼育する際のアドバイスや、飼育に必要なものなどを先生に伺ったため計2回（1回につき50匹ずつ）クマムシを提供していただいたが、1回目に比べて2回目の方が個体数の減少がなかった。

#### 3.3 実験③

クロレラの培養については、水道水と蒸留水など水の種類や、ハイポネックスやクロレラの濃度を変えるなど様々な条件で試したが、うまく培養せずに、死んでしまった。



図7 培養前



図8 培養後

#### 3.4 実験④

電気泳動のゲルの写真から、ヨコズナクマムシの体内において *GAPDH* が発現していることが示された。これより、PCR法で *GAPDH* 遺伝子を増幅させることができるとわかった。ただ、他にも増幅されている塩基対がある。これについては、プライマー同士が結合したものか、*GAPDH* 遺伝子の塩基配列に似たものがプライマーに結合したものと考えられる。

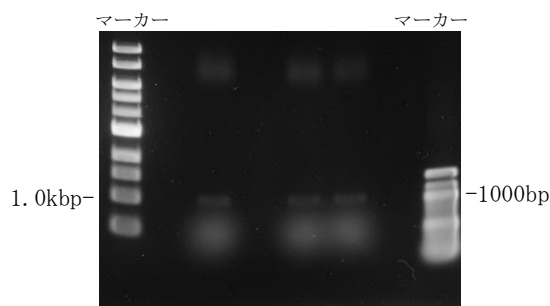


図9 電気泳動後の写真

#### 4. 今後の展望

現在ヒトの体内の *GAPDH* 遺伝子とクマムシの体内の *GAPDH* 遺伝子には配列に違いがあることが明らかになっている。クマムシの極限環境に対する耐性は他の生物と比べて *GAPDH* の安定性が高いことによるものだと仮定し、ヒトとクマムシの *GAPDH* の構造を比較することでクマムシが極限環境に耐性を示す一因の解明が期待できる。

そこで我々は本実験③の手順で得られたクマムシ *GAPDH* 遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、組み込んだベクターを大腸菌に入れることにより、大腸菌内でのプラスミドベクター上のクマムシ遺伝子から mRNA へ転写させ、タンパク質へ翻訳することを目指している。得られたタンパク質の結晶構造解析を行うことで、ヒトの *GAPDH* を構造解析したものと比較することができ、ヒトとクマムシの間にある極限環境への耐性の差が *GAPDH* にあるのか考察することが可能である。

また、先行研究よりクマムシは蘇生と乾眠を繰り返すと蘇生率が低下することから、蘇生と乾眠を繰り返した際に CAHS のタンパク質量が変化したことによって蘇生率が減少していると仮定した。クマムシ特有のタンパク質であり、乾眠に関係するとされている CAHS に注目し、蘇生と乾眠の繰り返した数で対照実験を行い、タンパク質量の変化を調べていきたいと考えている。

#### 5. 参考文献

- クマムシ類（緩歩動物門）の系統分類学入門 藤本心太 タクサ 日本動物分類学会誌 2021 年発行  
<https://www.iab.keio.ac.jp/research/highlight/papers/202103041208.html> 最終閲覧日 2023/1/30  
[https://www.nara-edu.ac.jp/cnee/Narakyou-InsectAndSoil\\_folder/Narakyou-InsectAndSoil/INSECT%20PAGES/TogekukmamusiSP.html](https://www.nara-edu.ac.jp/cnee/Narakyou-InsectAndSoil_folder/Narakyou-InsectAndSoil/INSECT%20PAGES/TogekukmamusiSP.html) 最終閲覧日 2023/1/30  
クマムシ博士のクマムシへんてこ最強伝説 堀川大樹 日経ナショナルジオグラフィック社 2017 年