

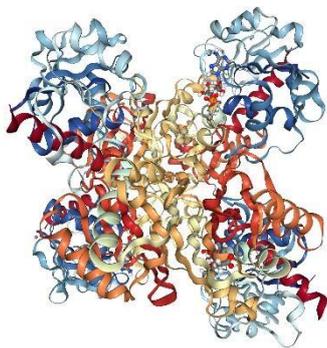
タンパク質 GAPDH から探るクマムシのストレス耐性

Stress tolerance in tardigrades: focus on their proteins

Abstract

Tardigrades are known for their ability to withstand extreme conditions by losing water. We focus on GAPDH protein, and this project aims to reveal the heat tolerance of GAPDH proteins by extracting and purifying the proteins. We have succeeded in obtaining GAPDH-expressing *E. coli* and used it to measure enzyme activity.

1. はじめに



クマムシは体長 1mm ほどの 8 本の足を持つ微小生物で、陸生種の多くは乾燥に強く乾燥した陸上環境にも生息している。水を失い仮死状態に移行することで、極限状態に耐えることができるクマムシのストレス耐性は、現在世界中の様々な分野で注目されている。先行研究ではクマムシに固有の CHAS (Cytoplasmic-abundant heat-soluble) タンパク質が繊維構造を形成して物理的安定性を高めることで細胞の耐性に寄与することが明らかになっている (Tanaka A et al, 2022)。しかし、真核生物で一般的に発現している GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) タンパク質 (図 1) とストレス耐性の関係は明らかにされていない。GAPDH タンパク質

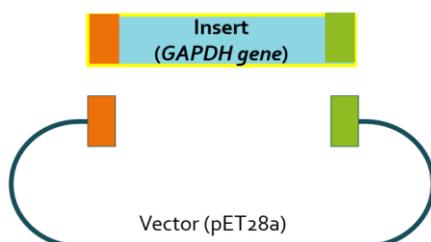
は、呼吸の解糖系の酵素としての機能を担っており、また細胞ストレスのセンサーとしての働きも知られている。

図 1 ヒト GAPDH タンパク質のリボンモデル

本研究では、ストレス耐性が大きいことで知られるヨコヅナクマムシを用いて、クマムシの GAPDH がほかの生物の GAPDH と比較して熱耐性に違いがあるか考察することを目的とする。クマムシ個体から直接 GAPDH タンパク質を獲得するには大量のクマムシを要するため、本研究では増殖のスピードが早い大腸菌を用いる。GAPDH 遺伝子のプラスミドを作成し、大腸菌に導入して GAPDH タンパク質を発現する大腸菌を作成し、そこからタンパク質を抽出・精製することを目指した。

2. 研究方法

(1) クマムシの GAPDH 遺伝子のクローニング



はじめに寒天培地からクマムシの個体を 10 匹取り出し、Direct-zol RNA MicroPrep キット (Zymo Research) を用いて抽出した mRNA を RT-PCR 法によって逆転写し cDNA を得た。5 μ L のベクター (pET28a) とインサート (GAPDH 遺伝子) を PCR 法を用いて増幅させ、それぞれの増幅が成功していることをアガロースゲル電気泳動にて確認した。

1mL チューブ中に GAPDH を 100ng と pET28a を 100ng となるよう混合させ、8 μ L まで滅菌水を加えた。そこに、2 μ L の In-Fusion 試薬を加え、軽く混ぜた。50 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートし、氷上で保管した。このように、In-Fusion 反応を起こし、GAPDH 遺伝子を組み込ん

だプラスミドを作成した (図2)。

図2 In-Fusion 反応のモデル図



氷上で30分放置したチューブを42°Cで1分インキュベートし、その後氷上で4分放置することでヒートショック法により大腸菌 DH5α 株を形質転換し、In-Fusion 反応を行ったプラスミドを取り込ませた。そしてLB培地をチューブに1mL加え、37°Cで1時間程度振盪培養した。その後チューブを回収し、大腸菌が沈殿する程度に10秒ほど遠心した。チューブの上清を少し取り除き、残りの溶液が100μL程度になるようにする。このチューブについて軽くピペティングした。大腸菌液をカナマイシンを加えた寒天LB培地上に滴下し、コンラージ棒で広げた。その後、37°Cのインキュベータに入れ、1晩培養した(図3)。

図3 形質転換により GAPDH 遺伝子を取り込み増殖した大腸菌

(2)GAPDH タンパク質の精製

発現したコロニーからキットを用いることでプラスミドを精製し、それを XhoI 制限酵素で切断し In-Fusion 反応が成功していることを確認した。その後 BL21 (DE3) 株にヒートショックを行い、遺伝子組み換えを行った GAPDH 遺伝子を取り込ませた。カナマイシンを加えた LB 液体培地の入ったチューブにコロニーをつついた爪楊枝を入れ、6時間ほど37°Cで振盪培養した。最後に液体培地を4°C、6000rpmの条件で10分間遠心し、沈殿物のみ4°Cで保管した。

(1)で獲得した菌体ペレットを、40mLの破砕バッファー(20mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl, 5mM imidazole, プロテアーゼインヒビター)で懸濁した。50mL遠心管を氷水の入ったビーカーに突き刺し、5秒ずつ、合計10分程度超音波破砕を行った後、20,000×g, 4°Cで30分以上遠心した。

シリンジを用いて、ニッケルがチャージされているカラム(EconoFit Nuvia IMAC Column, Ni-charged, 1 x 1 ml #12009288, BIO RAD)を、2mLの平衡化バッファー(20mM Tris-HCl pH 8.0, 200mM NaCl, 5mM imidazole)で置換してから、ニッケルに吸着する性質を持つ His Tag がついている GAPDH タンパク質を含むサンプルをロードした。そして、3mLのwashバッファー(20mM Tris-HCl pH 8.0, 200mM NaCl, 40mM imidazole)でカラムを洗浄してから溶出バッファー(20mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl, 250 mM imidazole)でGAPDHタンパク質を溶出させた。

その後、SDS-PAGEによってGAPDHタンパク質の獲得を確認した。そして、5Lの透析バッファー(20 mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl)に透析チューブを入れ、一晩透析した。

(3)酵素活性測定

精製したGAPDH 1μL、100mMのNAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)20μL、K2HPO4を10μL、Tris Bufferを溶液量が1mLになるようセルに入れた。そして、100mMのG3P(基質、glyceraldehyde 3-phosphate)の終濃度を0.1mM、0.5mM、1mM、2mMに変えてセルに入れた。反応の仕組みは図4と図5のとおりである。GAPDHはG3Pを基質として、1,3-BPGに変化させる化学反応を触媒する。その際に無色のNAD+が還元され黄色のNADHが生じる。そのため、セルに340nmの波長の光を当てた22°Cでの吸光度の変化を3回ずつ、10分程度記録し、酵素活性を測定した。

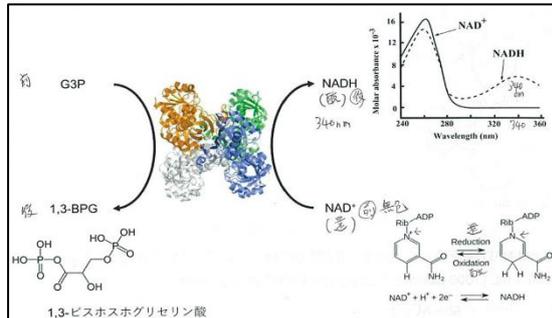
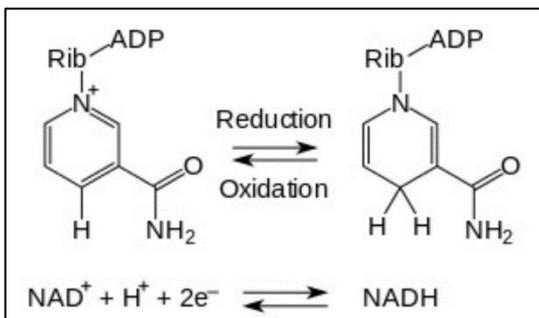


図4 NADH と NAD⁺の反応

図5 GAPDH の触媒作用

(4)分子構造の比較

オープンソースの分子グラフィックツールである PyMOL を用いて、すでに明らかになっているクマムシのアミノ酸配列からモデル構造をコンピュータ上に表示させた。アミノ酸配列から予想されたクマムシの GAPDH 構造とヒトの GAPDH を重ね合わせ比較した(図6)。図7は分子同士が接触している相互作用界面付近の拡大図である。暗い色がヒトの、明るい色がクマムシの GAPDH を表す。

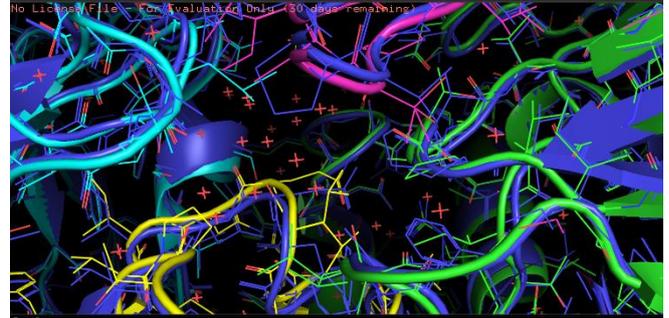
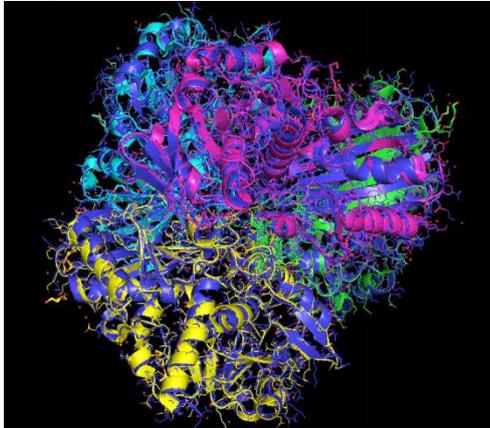


図6 ヒトとクマムシの GAPDH の構造の比較

図7 相互作用界面の拡大図

(5)結晶化条件の特定

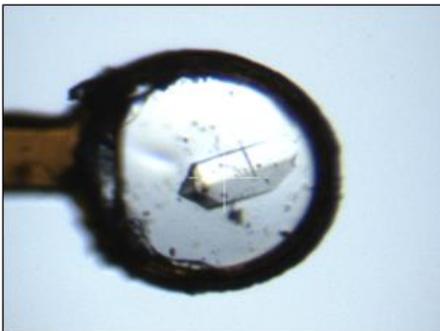
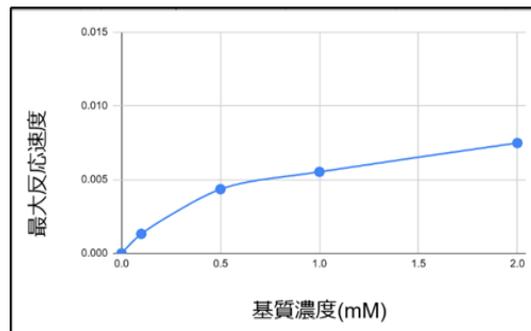
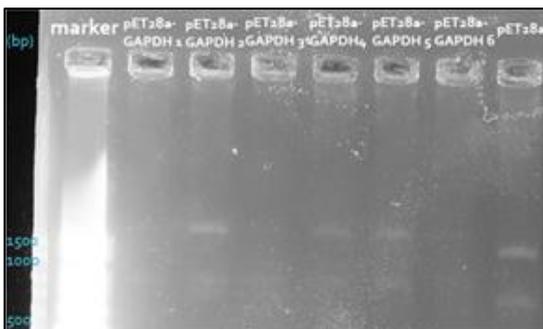


図8 析出した GAPDH タンパク質の結晶

結晶化プレートに GAPDH タンパク質を 0.1 μ L ずつ滴下したところ、0.1 M Magnesium chloride hexahydrate、0.1 M Tris 8.533 % v/v PEG 400、0.1 M Sodium chloride の条件下で結晶が析出することが明らかになった。結果は図8のとおりである。

3. 結果

電気泳動を行った結果、PCR 法により *GAPDH* と pET28a が増幅したことを確認できた。図9の一番左のレーンはマーカーを、一番右のレーンは pET28a のみ、残りのレーンは pET28a に *GAPDH* 遺伝子を組み込んだプラスミドを泳動した。pET28a-*GAPDH* のレーンに注目すると、pET28a のみのバンドより pET28a に *GAPDH* 遺伝子を組み込んだバンドの位置が高くなっていることがわかる。このことから、In-Fusion 反応が成功していることがわかる。そして精製では SDS-



PAGE によって GAPDH の精製が成功していることを確認した。また、図10は GAPDH タンパク質に基質濃度を変化させたときの酵素活性の

測定結果である。最大反応速度は 0.0075 だった。吸光度測定から酵素の活性を確認した。吸光度変化直線の傾きから反応の最大速度を求めた。

図9 *GAPDH*組み換え遺伝子の電気泳動結果 図10 酵素活性の測定結果

4. 考察／結論

ヨコヅナクマムシの個体の RNA から抽出した *GAPDH* 遺伝子を用いて、*GAPDH* タンパク質を発現する大腸菌の作成に成功したといえる。PyMOL で分子構造を比較した結果において、相互作用界面はクマムシの予測構造とヒトの構造で異なっており、アミノ酸の配列が構造の形成に関わっていると考えられる。また、この差異がタンパク質の安定性、つまりストレス耐性に関わっている可能性がある。

5. 今後の課題

今後は熱酵素活性測定を行い、その測定結果を他の生物の *GAPDH* の活性と比較することで、クマムシの *GAPDH* の熱耐性は他の生物よりも大きいのか明らかにしていきたい。また *GAPDH* タンパク質の結晶については、X 線を照射したデータを PC ソフトで解析し、遺伝子配列の違いがタンパク質の結合部分の耐性にどのような影響を及ぼすのか考察していきたい。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さった大阪大学大学院薬学研究科創成薬学専攻 福田庸太先生に深くお礼申し上げます。

7. 参考文献

Tanaka A, Nakano T, Watanabe K, Masuda K, Honda G, Kamata S, et al. (2022) Stress-dependent cell stiffening by tardigrade tolerance proteins that reversibly form a filamentous network and gel. PLoS Biol 20(9)

東端 啓貴(2013) 生物工学基礎講座 バイオよもやま話 大腸菌を宿とした異種タンパク質高発現のイロハ(解説)

生物工学会誌(0919-3758)91 巻2号 Page96-100(2013.02)

恩田真紀(2008) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 蛋白質科学会アーカイブ, 1, e011(2008)

<https://docs.anaconda.com/free/miniconda/> (2024年2月7日アクセス)