

Title	クマムシ：極限環境を生きる究極生物
Sub Title	Tardigrades : ultimate animals surviving extreme environments
Author	堀川, 大樹(Horikawa, Daiki) 荒川, 和晴(Arakawa, Kazuharu)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	Keio SFC journal Vol.15, No.1 (2015. ) ,p.246- 260
JaLC DOI	10.14991/003.00150001-0246
Abstract	クマムシは環境ストレスに対する耐性の高さから、多細胞生物の極限環境耐性機構を知る上で有用なモデルとなりうる。著者らはヨコヅナクマムシの飼育系を構築するとともに、同種の標準系統であるYOKOZUNA-1を樹立した。ヨコヅナクマムシは乾燥や放射線などに対して高い耐性を有することも確認された。YOKOZUNA-1のゲノム解析により、およそ19,000の遺伝子が予測された。さらに、ヨコヅナクマムシでは乾眠前後における遺伝子発現変動はあまりみられないが、低分子化合物レベルではドラマチックな代謝応答がおきていることがメタボローム解析によりわかってきた。
Notes	特集 世界を救え：SFCバイオの挑戦#招待論文#第3章 SFCが関連するおもしろ生命科学
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0402-1501-0246">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0402-1501-0246</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

[招待論文]

## クマムシ～極限環境を生きる究極生物

### Tardigrades—Ultimate Animals Surviving Extreme Environments

堀川 大樹

慶應義塾大学 SFC 研究所 上席所員

Daiki D. Horikawa

Senior Researcher, Keio Research Institute at SFC

荒川 和晴

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科 特任准教授

Kazuharu Arakawa

Project Associate Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

**Abstract:** クマムシは環境ストレスに対する耐性の高さから、多細胞生物の極限環境耐性機構を知る上で有用なモデルとなりうる。著者らはヨコヅナクマムシの飼育系を構築するとともに、同種の標準系統である YOKOZUNA-1 を樹立した。ヨコヅナクマムシは乾燥や放射線などに対して高い耐性を有することも確認された。YOKOZUNA-1 のゲノム解析により、およそ 19,000 の遺伝子が予測された。さらに、ヨコヅナクマムシでは乾眠前後における遺伝子発現変動はあまりみられないが、低分子化合物レベルではドラマチックな代謝応答がおきていることがメタボローム解析によりわかってきた。

Since tardigrades exhibit high tolerance to environmental stresses, the animals have been expected as a potential model organism for understanding mechanisms underlying extremotolerance of multicellular organisms. In order to develop tardigrades as a model animal, we established a culture system for the tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and a standard strain YOKOZUNA-1 from single egg of this species. *R. varieornatus* showed high tolerance to desiccation and ionizing radiation. The estimated number of genes in *R. varieornatus* is approximately 19,000 genes based on our whole genome analysis. Furthermore, our metabolomic analysis detected significant differences in amounts of several low-molecular-weight metabolites between hydrated and anhydrobiotic states in *R. varieornatus*, while there are only a few differentially expressed genes between the both states in this species.

**Keywords:** クマムシ、乾眠、極限環境耐性、ゲノム、メタボローム

tardigrades, anhydrobiosis, extremotolerance, genomics, metabolomics

## 1 はじめに

クマムシはその環境耐性の高さから、しばしば地上最強の生物と称される。クマムシとは緩歩動物門 (Tardigrada) を構成する動物群の総称である。無脊椎動物であるクマムシの体長はおおむね 1 mm 以下であり、関節を欠いた 4 対の肢をもつ。緩歩動物門には 1000 を超える種が記載されており、大きく真クマムシ綱と異クマムシ綱の二つのグループに分けられる。真クマムシ綱の体は全体的に細長く、半透明をした種類が多い。その一方で、異クマムシ綱はややずんぐりした体型をしており、装甲のような外皮に覆われていたり、表に突起をもつものも多い (Kinchin, 1994)。緩歩動物門と近縁の分類群として節足動物門と有爪動物門などがあげられる。緩歩動物門の系統上の位置づけはまだ決着がつかないが、これらの分類群は汎節足動物として単系統になると考えられている (Campbell *et al.*, 2011)。

クマムシは陸地、湖沼、海などさまざまな環境に生息し、その分布域も広範である。南極や北極などの極地でも、クマムシは高頻度で見られる。市街地の路上に群生するコケ類や、街路樹の表面に生えた地衣類からも、クマムシがよく見いだされる。陸上に生息する種類を含め、すべてのクマムシは水生種であり、少なくとも体表が一層の水の膜で覆われていないかぎり、この生物は活動することができない。ただし、大半の陸生種のクマムシは、環境から水がなくなると乾眠とよばれる無代謝状態に移行し、乾燥条件下を生き延びることができる。水は生命活動にとって必要不可欠であるが、クマムシは水を失っても生体構造が機能を失わずに保存されるようなメカニズムを備えている (Keilin, 1959)。乾眠状態のクマムシは長期の生存が可能となる。乾眠状態のオーベルハウザヤマクマムシ *Ramazzottius oberhauseri* の卵が室温で 9 年間保存された後に吸水し孵化した記録もある (Guidetti and Jönsson, 2002)。

乾眠状態のクマムシは、様々な環境ストレスに耐性をもつことでも知られる。-273°C 度の超低温 (Becquerel, 1950)、ヒトの致死量のおよそ一千倍に相当する線量の放射線 (May *et al.*, 1964; Horikawa *et al.*, 2006)、アルコールなどの有機溶媒 (Ramløv and Westh, 2001)、紫外線 (Horikawa *et al.*, 2013)、7.5GPa までの高圧 (Ono *et al.*, 2008)、真空 (Horikawa *et al.*, 2012) などの極

限環境に耐える。放射線に対しては通常の活動状態でも高い耐性をもつ。

クマムシはその耐性の高さから、アストロバイオロジーの研究材料としても有用である。2007年には欧州宇宙機関(ESA)により、乾眠状態のオニクマムシ *Milnesium tardigradum* などが低軌道環境に10日間さらされた(Jönsson *et al.*, 2008)。低軌道環境の真空にのみさらされ紫外線には暴露されなかった個体については、地上に保存されていた対照群と比べ、生存率の有意な低下はみられなかった。低軌道環境において真空と紫外線の両方を同時に暴露された場合、ほとんどの個体は死亡したものの、わずかに生存していた個体も確認された。このことから、クマムシのような多細胞の生命体が乾燥状態で宇宙環境に存在しうることが示唆された。

本稿ではクマムシの実験システム確立からその耐性メカニズムについて、著者らの研究成果を中心に論じる。(Fig. 1 参照)

## 2 飼育システムの開発

クマムシについての研究では、長年にわたり野生の個体を用いて生理学的な実験を行うことが慣習となっていた。クマムシを研究対象とする科学者の



Fig. 1 ヨコヅナクマムシの電子顕微鏡写真。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。(撮影：荒川和晴)

絶対数が少ないため、この生物の食性など生態学的知見はきわめて乏しい。このため、実験室でクマムシの人工飼育を行うことが困難だった。生物学研究において、研究対象とする生物を安定的に確保することはきわめて大事である。実験生物の遺伝的背景のばらつきを少なくしたり、環境条件や栄養条件を一定にすることで実験生物個体間の生理状態の差を小さくするためにも、実験生物の飼育および培養のシステム構築は重要であった。

2000年を過ぎたころ、ようやく一部のクマムシ種についての飼育システムが報告されるようになった。アルティエロとレベッキ (2001) は真クマムシ綱の4種類について、寒天培地上で継代飼育を成功させたことについて報告した。餌としては、種ごとにセンチウヤや緑藻類を用いた。鈴木 (2003) は肉食性クマムシのオニクマムシを同じく寒天培地上で継代飼育することに成功した。オニクマムシの餌には微小動物であるワムシ *Lecane inermis* を用いた。これらの業績はクマムシを実験生物として確立する上でのブレイクスルーとなった。だが、両者により報告されたクマムシ種は増殖効率が芳しくなかったり、飼育に手間がかかったりするため、より効率的に飼育をできるクマムシ種を探索する必要があった。

堀川らは北海道札幌市に群生するコケから採集したヨコヅナクマムシ *Ramazzottius varieornatus* が、特定の緑藻類の銘柄 (生クロレラ V12, クロレラ工業株式会社) を餌として増殖することを確認した (Horikawa *et al.*, 2008)。25°C にて寒天培地上でヨコヅナクマムシを飼育し生活史を調べたところ、平均寿命はおおよそ35日間であった。この日数は、これまでに知られているクマムシ種の中でもっとも短い寿命である。1個体あたりの生涯産卵数は平均でおおよそ8個であり、この値は他のクマムシ種に比べると少ない。一方で、産卵から孵化するまでの期間はおよそ5日間と、相対的に短かった。ヨコヅナクマムシは1個体のみで飼育した場合でも産卵し仔が生じることから、本種は単為生殖をおこなっていることが示唆された。そこで、堀川らは1個体のヨコヅナクマムシに由来する標準系統 YOKOZUNA-1 を確立した。(Fig. 2 参照)

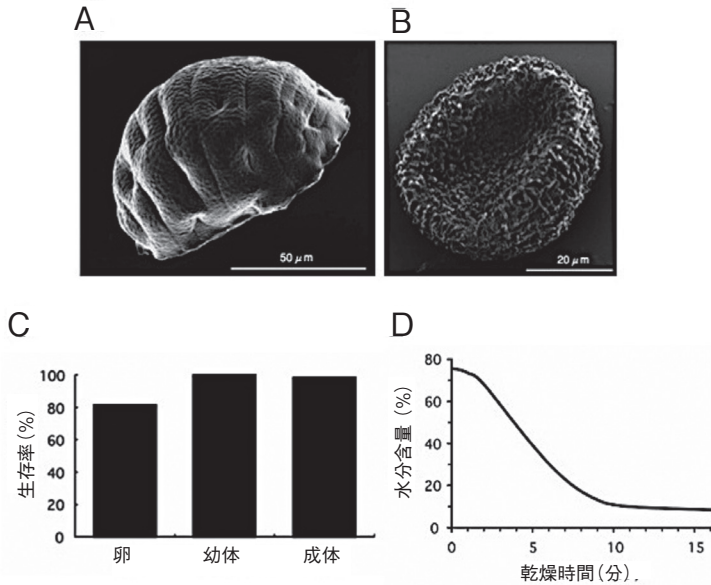


Fig. 2 A, B 乾眠状態におけるヨコヅナクマムシの成体 (A) と卵 (B) の電子顕微鏡写真。C 卵、幼体 (3 日齢)、成体 (20 日齢) のヨコヅナクマムシにおける 10 日間の乾燥処理後の生存率。D 相対湿度 85% 下において乾燥処理を受けた成体のヨコヅナクマムシの水分含量の変化。

### 3 乾眠と極限環境耐性

#### 3.1 乾眠

上述したように、陸生クマムシの多くは水を失うと乾眠とよばれる無代謝状態に移行する。クマムシは乾眠状態に移行すると体が縦方向に収縮して樽 (tun) とよばれる形態に変化し、水分含量が 3% 以下にまで低下する (Wright, 2001)。堀川らはヨコヅナクマムシの乾眠、すなわち乾燥耐性の程度を調べるために、本種の個体を乾燥に暴露し生存率を算定するとともに水分含量の変化を追跡した。まず、発生段階ごとにどの程度の乾燥耐性が見られるのかを調査するため、本種の卵、3 日齢の幼体、20 日齢の成体を相対湿度 85% で 1 日間、さらに相対湿度 0% で 10 日間乾燥させた。乾燥処理後、幼体と成体は典型的な樽の形態を (Fig. 2A)、卵は中央がくぼんだ形態

を示した (Fig. 2B)。乾燥個体に給水したところ、幼体と成体ではほぼすべての個体が活動を再開し、卵では 80% の個体が孵化した (Fig. 2C)。この数値は乾燥処理をしなかった卵の孵化率と同等である。この結果から、ヨコヅナクマムシはいずれの発生ステージにおいても乾眠能を保持していることが示唆された。

乾燥処理の前後におけるヨコヅナクマムシの成体の体重を精密電子天秤で測定して水分含量の変化を調べたところ、通常の活動状態における水分含量が 78.6% wt/wt だったのに対し、乾眠状態では 2.5% wt/wt まで減少することがわかった。また、相対湿度 85% の環境で乾燥処理をすると、最初の 5 分間で、もとの水分量の半分が失われ、乾燥開始から 16 分後には水分含量がおおよそ 10% wt/wt にまで低下することがわかった (Fig. 2D)。これらの結果から、ヨコヅナクマムシは急速な脱水でも生命を失うことなく乾眠に移行することが明らかになり、生物の乾燥耐性メカニズムを研究する上で本種はきわめて適した研究対象であるといえる。

通常、細胞から水分が無くなると、細胞膜のような構造が壊れたり、タンパク質やその他の生体物質の構造が崩れる。クマムシはどのようなメカニズムで乾燥した細胞や生体物質を保護しているのだろうか。他に乾眠能をもつアルテミア、センチュウ、ネムリユスリカなどの動物では、乾眠に付随して多量 (15 ~ 20% wt/wt) のトレハロースという二糖類が蓄積する (Watanabe, 2006)。トレハロースは乾燥した細胞の中で水の代わりに細胞膜やタンパク質と相互作用をして構造を維持していると考えられた (Crowe *et al.*, 1998)。クマムシでも、乾眠に伴ってトレハロースが蓄積することが報告されているが、他の乾眠能をもつ動物と比較すると、その蓄積量は 3% 未満であり、きわめて少ない (Westh and Ramløv, 1991; Hengherr *et al.*, 2008)。また、トレハロースの蓄積がまったくみられない種も存在する (Hengherr *et al.*, 2008)。クマムシでは、トレハロースではなく別の物質が乾眠の成立に重要であることが示唆される。Yamaguchi *et al.* (2013) は、ヨコヅナクマムシに熱しても凝集と沈殿のおこらない新規タンパク質の CAHS (Cytoplasmic Abundant Heat Soluble: 細胞質型熱安定性) タンパク質と SAHS (Secretory Abundant Heat Soluble: 分泌型熱安定性) タンパク質を発見した。これら



のタンパク質は乾燥するとコイル状の構造 ( $\alpha$ ヘリックス構造)をとる。CAHS タンパク質は細胞内に、SAHS タンパク質は細胞外の空間に蓄積する。これらのタンパク質は、細胞膜や他のタンパク質と相互作用し、これらの構造を保護したり、凝集するのを防いでいる可能性がある。他にも抗酸化物質などがクマムシの乾眠において重要な役割を担うと考えられるが、実際に乾燥耐性を成立させる物質の特定はまだなされていない。一方で、同じくヨコヅナクマムシにて発見されたミトコンドリアに局在する RvLEAM 及び MAHS (Mitochondrial Abundant Heat Soluble) タンパク質は、ヒト培養細胞に導入することでその浸透圧耐性をわずかながらに上げることが確認された (Tanaka et al., 2015)。乾眠にはこのように直接的に水を置換し細胞内分子を保護する仕組みの他にも、水を排出するアクアポリンや、乾燥を感知し細胞中にシグナルを送る機構、さらには損傷を修復する機構など、多階層のシステムが不可欠であると考えられる。

### 3.2 極限環境耐性

以上に述べてきたように、乾眠状態においてクマムシはさまざまな環境ストレスに耐える。ただし、これまでにクマムシの耐性について調査をしたほとんどの研究例においては、ストレスを暴露したクマムシについて、その後数日間の生死しか確認していなかった。クマムシの環境耐性をより正確に検証するうえでは、ストレスを暴露された個体の生殖能力を調べることが重要である。そこで堀川らは、7日齢のヨコヅナクマムシを 100°C の高温、1 GPa の高圧、および 5 kGy のヘリウムイオンビーム照射を暴露し、人工飼育システムを用いて被暴露個体の生殖能力を追跡調査した (堀川ら、未発表)。その結果、100°C と 1 GPa に暴露された個体は、非処理区の個体と同等かそれ以上の期間にわたって生存したうえ、次世代の個体を残すことがわかった (Fig. 3AB)。ヘリウムイオンビームを照射された個体では、非照射区の個体に比べて生存期間の短縮がみられた。さらに、1 個体あたりに残した仔の数も減少した (Fig. 3AB)。通常、生物は 100°C の高温や 1 GPa の高圧に暴露されると、タンパク質などの生体高分子の立体構造が崩れてその機能を失い、生命活動を維持することができなくなり、最終的には死滅する。これは、



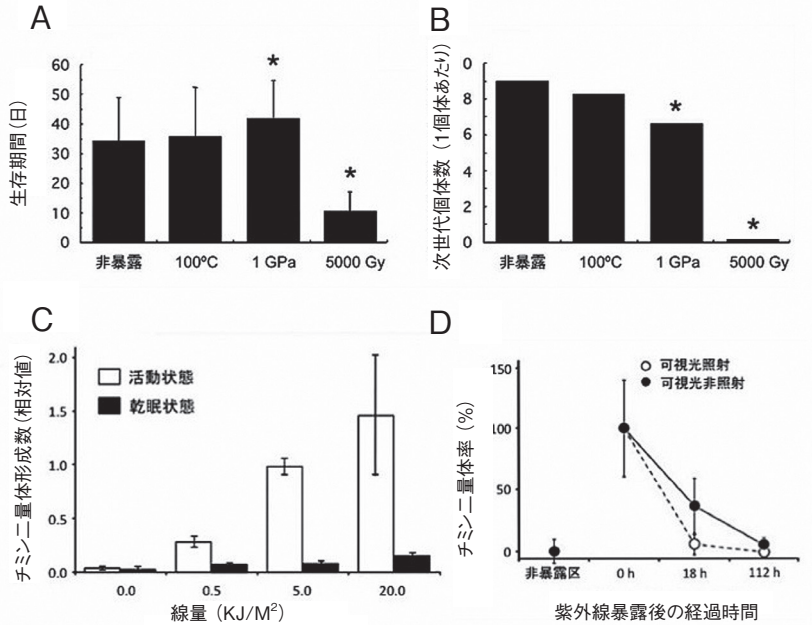


Fig. 3 A 乾眠状態のヨコヅナクマムシを 100°C、1 GPa、ヘリウムイオンビーム (5000 Gy) に暴露後の A 生存期間および B 次世代幼体数。C 活動状態および乾眠状態のヨコヅナクマムシに紫外線を照射後の DNA におけるチミン二量体形成頻度。D 活動状態のヨコヅナクマムシに 2.5 kJ/m<sup>2</sup> の紫外線照射後、可視光を照射した場合としない場合における DNA におけるチミン二量体の修復。

水分子と結合した生体高分子が熱や高圧により変性しやすいことと関係している。乾眠状態のクマムシは水分をほとんど含有しておらず、高温や高圧に暴露されても損傷がほとんど生じなかったものと推察される。その一方で、イオンビームのような電離放射線は生体分子を直接的あるいは間接的に破壊する作用をもつ。5 kGy の線量のイオンビームを照射されたヨコヅナクマムシの個体は、通常生命活動を維持できないほど損傷が蓄積したため、寿命の短縮や生殖能の低下がおきたのだろう。だがいずれにしても、バクテリアのような単細胞生物ではなく、クマムシのような多細胞生物がこれらの極限環境にさらされても子孫を残した事実は、地球外に存在しうる生命体の分布域を再考するのに十分に値するものと考えられる。

著者らはまた、ヨコヅナクマムシを用い、宇宙環境において生命にとってもっとも有害な環境要因のひとつである紫外線への耐性も調査した (Horikawa *et al.*, 2013)。ヨコヅナクマムシは乾眠状態において、活動状態よりも顕著に高い紫外線 (UV-C; 波長 254 nm) に対する耐性を示した。乾眠状態においては、20 kJ/m<sup>2</sup> の線量の紫外線を照射された個体で産卵がみられた。だが、活動状態では、5 kJ/m<sup>2</sup> 以上の線量の紫外線を照射されると、照射 10 日後には 90% 以上の個体が死亡し、産卵もおこななかった。紫外線照射後のヨコヅナクマムシの DNA 損傷について解析したところ、乾眠状態で照射された場合は活動状態で照射された場合に比べてチミン二量体の形成がほとんどおきていなかった (Fig. 3C)。通常、紫外線が照射されると、DNA 上の隣接した塩基 (特にチミンやシトシンなどのピリミジン) が結合し、二量体を形成する。このような二量体は突然変異を誘発するなど、生物に有害な影響を及ぼす。ヨコヅナクマムシは、乾眠状態時において、チミン二量体が形成されるのを防ぐ機構が存在することを示唆している。また、活動状態のヨコヅナクマムシでは、2.5 kJ/m<sup>2</sup> の紫外線照射後に生成したチミン二量体が 112 時間後にはほぼ完全に消失した (Fig. 3D)。ヨコヅナクマムシのゲノムデータベースを用いた検索およびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による解析から、ショウジョウバエの光回復型 DNA 修復酵素 PhrA のホモログ遺伝子 (注: 共通の祖先遺伝子に由来する遺伝子どうしのこと) をもつことが明らかになった。定量 PCR による解析の結果、紫外線照射 18 時間後に PhrA 遺伝子の有意な発現上昇がみられた。このことから、ヨコヅナクマムシの DNA 修復機構に PhrA が関わっている可能性が示唆された。

## 4 オミックス解析

### 4.1 ゲノム解析

クマムシはその微小なサイズや数千という少ない細胞数からいわゆるオミックス解析が困難であったが、ヨコヅナクマムシの標準系統 YOKOZUNA-1 が確立されたことにより数千～数万匹オーダーの大量飼育が可能となり、2008 年頃からまずはゲノムの解析が進められた。クマムシのゲノムは一般

的に小さく数百 Mbp 程度であることが知られているが (Gagna and Guidi, 1996)、ヨコヅナクマムシのゲノムサイズはデンシトメトリー法により約 60Mbp と極めてコンパクトであることから、ゲノム解析に適していることが窺えた。主にサンガー法を用いて解析が進められたヨコヅナクマムシゲノムは最終的に約 55Mbp の配列が得られ、そのうち 1Mbp 以上のコンティグ配列わずか 16 本で 51Mbp 以上をカバーする極めてクオリティの高いアセンブリーが得られた (Katayama and Kunieda, 2010)。独自に固有の門を形成するクマムシにおいては、配列類似性を頼りにする既存の遺伝子予測並びに機能アノテーションが極めて困難である。そこで、筆者らは特異度 (Specificity) が高い手法で一次学習を行った後に感度 (Sensitivity) が高い手法で二次学習を行うハイブリッドブートストラップ学習法を考案し、さらに RNA-Seq によって得られた発現遺伝子部位の情報を組み合わせることで、精度高く約 19,000 の遺伝子を予測した。前述した CAHS/SAHS/MAHS/RvLEAM や PhrA ホモログの解析はこのような高いクオリティのゲノム配列及び機能アノテーション情報があったために可能になったと言える。

近年の著しい DNA シーケンサーの発展に伴い、我が国以外の研究グループにおいてもクマムシゲノムの解析が進められている。オニクマムシを扱っているドイツ・シュトゥットガルト大学のグループらは、主に EST (Expressed Sequence Tag) 解析により発現している遺伝子の配列解析を進めている。ゲノム情報がまだ存在しないため、de novo トランスクリプトームアセンブリーによるコンティグ数は 79,064 と精度は必ずしも高くないが、通常時と乾眠及び吸水復帰時の 3 つのタイムポイントにおける発現量の比較から、乾眠関連の発現変動遺伝子 834 個を報告している (Wang *et al.*, 2014)。また、エジンバラ大学のグループは、超並列 DNA シーケンサーを用いたドゥジャルダンヤマクマムシ *Hypsibius dujardini* ゲノムの解析とアセンブリーをオンラインで公開している ([http://badger.bio.ed.ac.uk/H\\_dujardini/](http://badger.bio.ed.ac.uk/H_dujardini/))。こちらは総塩基長が推定ゲノムサイズの倍程度あり、コンティグ数が 13,202 個でコンティグ N50 が約 50Kbp とまだ早期なドラフトゲノム段階ではある。ドゥジャルダンヤマクマムシはヨコヅナクマムシと同じヤマクマムシ科 (Family Hypsibiidae) に属する近縁種でありながら、ヨコヅナ

クマムシと比すると極めてゆっくりとした乾眠移行を必要とし、紫外線耐性については前述の (Horikawa *et al.*, 2013) でも示した通りその極限環境耐性も弱いことから、比較ゲノム解析により乾眠に必要な遺伝子が明らかにできると考えられる。

#### 4.2 メタボローム解析

ヨコヅナクマムシのゲノム及びトランスクリプトーム解析によって水を置き換える超可溶性タンパク CAHS/SAHS が発見されたが、さらに驚く事に、これらタンパクはヨコヅナクマムシにおいてその極めて早い乾眠を実現するために、常時大量に発現されていることが明らかとなった。既に述べたように、ヨコヅナクマムシは周囲の乾燥に際し、5分程度で体内の水分量を半分にするが、この乾眠応答に要する時間は、細胞内で遺伝子発現を行い必要なタンパク質を生産するのにかかる時間に対し、あまりにも短い。このような遺伝子発現では対応しきれない短時間での乾眠に対応できる可能性として、低分子化合物の存在が考えられるため、我々は通常状態と乾眠状態の比較メタボローム解析を行っている。クマムシのメタボローム解析としては、オニクマムシを解析しているドイツのグループがガスクロマトグラフィ質量分析器 (GC-MS) によって 84 分子の測定を報告しているが (Beisser *et al.*, 2012)、揮発性及び揮発化が可能な分子以外の測定が困難な GC-MS では網羅的な中心代謝の計測は現実的ではない。そこで、我々はイオン性代謝物の測定にキャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis: CE) を、脂質や糖などの中性物質の測定に液体クロマトグラフィ (Liquid Chromatography: LC) を、精密質量数を得るために飛行時間型質量分析器 (Time-of-flight Mass Spectrometry: TOFMS) と組み合わせた CE-TOFMS 及び LC-TOFMS システムを用いて解析した。その結果、8 種の糖、373 種の脂質、269 種の同定されたイオン性化合物、さらに、1,328 種の未知ピークを得て、ヨコヅナクマムシ内の網羅的な代謝プロファイルを取得することに成功した (Arakawa, 2012)。

通常時と乾眠時 (それぞれ N=3) のプロファイルの比較では、数十の分子が Welch T 検定によって有意な変動を示し、その中にはクマムシ以外の

---

生物で乾眠に深く関わっていることが報告されているトレハロースも含まれていた。一方で、トレハロースの絶対量はクマムシ乾燥重量の1%にも満たず、他の生物で知られているようなガラス化による生体分子の保護には十分な量ではない可能性が示唆された。一方で、乾眠時には代謝パスウェイにおいて広範囲で脂質やアミノ酸や高エネルギーリン酸結合を持つ核酸が減少し、さまざまな断片の脂肪酸や、キレート分子やベタインなどが増加していることが分かった。特に、コリン代謝経路が乾眠時に大きな変動を示しており、キレート分子やベタインなどと共に水が減少する際に生じる酸化・pH・浸透圧のストレスに対して、これらの低分子化合物が迅速に細胞内の構成要素を保護する役割を持つ可能性が考えられる。ヨコヅナクマムシの乾眠はその短時間の移行時間から遺伝子発現を通してみると驚くほどに変動がないが、このように、網羅的なメタボローム解析を行う事で、細胞内の水分の喪失という細胞にとって最も危機的な状況に対し、細胞内では迅速な応答が可能な低分子化合物のレベルでダイナミックな代謝応答を行っていることが示された。

## 5 今後の展望

クマムシの乾眠は、生命活動が一時的に停止した無代謝状態である。この現象を模倣することで、細胞レベルから個体レベルまでの生物材料の乾燥保存を実現できるかもしれない。とりわけ、移植用臓器の長期乾燥保存法が確立されれば、多くの人命を救うことにつながる。このためにも、クマムシにおける乾眠のメカニズム解明は重要な課題である。乾眠のメカニズムを知るには、乾燥ストレスから細胞構造や生体高分子を保護したり、あるいは、乾燥ストレスによる損傷の修復にかかわる物質群を特定する必要がある。乾眠状態と通常状態のクマムシにおける遺伝子発現や代謝物質変動については上述したとおりだが、今後のさらなるオミックス解析などにより、乾眠の移行とそこから回復にともなう代謝経路の全貌が明らかになることが期待される。

現状ではクマムシのオミックス解析はまだ限定的であり、今後乾眠の詳細なメカニズム及びその進化を明らかにするためにはより多くの種で、より細

かいタイムポイントでの解析が不可欠である。特に、乾眠においては現状通常及び乾眠の2状態の解析が主であり、給水後に停止した代謝がさまざまな生体分子の修復を伴いながら再開の様についてはほとんど解析が進められていない。また、これらの解析は飼育が可能なヤマクマムシに集中しており、オニクマムシを含めても全て真クマムシ綱の生物種に限られている。異クマムシにも乾眠する種は多く存在しており、また異クマムシの方が緩歩動物門における祖先型に近いと考えられているため、今後は飼育が困難な種でも解析ができるよう、網羅的解析技術の劇的な高感度化が望まれる。実際、現状では1回のメタボローム解析に1万匹(約5mg)の個体が必要であり、N=3で複数条件の解析を行うには数十万匹の個体を集めねばならず、これは飼育が可能な種においても困難を伴う。一方で、核酸を扱う解析に関してはポリメラーゼ連鎖反応による増幅が可能のため、より少ない初発量からの解析を実現するための技術開発が望まれる。

MAHSではヒト細胞の高浸透圧耐性を上げることが確認されているが、ヒト細胞の乾燥耐性を向上させるような分子はまだ確認されていない。今後、乾燥耐性を向上させるような新規の分子が発見されることも十分に考えられるが、ヒト細胞などに複数の分子を共発現させて耐性を付与できるかを確認することも重要だろう。クマムシの乾眠にかかわる候補分子の特定とともに、今後はバイオエンジニアリングの系も発展させていきたい。

## 引用文献

- Altiero T. and Rebecchi L., "Rearing tardigrades: results and problems." *Zoologischer Anzeiger*, 240, 2001, pp.217-221.
- Arakawa K., "Comparative metabolomics of anhydrobiosis in tardigrade *Ramazzottius varicornatus*." *Journal of Japanese Society for Extremophiles*, 11, 2012, pp.75-82.
- Becquerel P., "La suspension de la vie au dessous de 1/20 K absolu par demagnetization adiabatique de l'alun de fer dans le vide les plus élève." *Comptes-rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences deParis*, 231, 1950, pp.261-263.
- Beisser D., Grohme M.A., Kopka J., Frohme M., Schill R.O., Hengherr S., Dandekar T., Klau G.W., Dittrich M. and Müller T., "Integrated pathway modules using time-course metabolic profiles and EST data from *Milnesium tardigradum*." *BMC*
-

- Systems Biology*, 6, 2012, p.72.
- Campbell L.I., Rota-Stabelli O., Edgecombe G.D., Marchioro T., Longhorn S.J., Telford M.J., Philippe H., Rebecchi L., Peterson K.J. and Pisani D., "MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 2011, pp.15920-15924.
- Crowe J.H., Carpenter J.F. and Crowe L.M., "The role of vitrification in anhydrobiosis." *Annual Review of Physiology*, 60, 1998, pp.73-103
- Garagna S., Rebecchi L. and Guidi A., "Genome size variation in Tardigrada." *Zoological Journal of the Linnean Society*, 116, 1996, pp.115-121.
- Guidetti R. and Jönsson K.I., "Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans." *Journal of Zoology*, 257, 2002, pp.181-187.
- Hengherr S., Heyer A.G., Koehler H.R. and Schill R.O., "Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades—evidence for divergence in responses to dehydration." *FEBS Journal*, 275, 2008, pp.281-288.
- Horikawa D.D., Cumbers J., Sakakibara I., Rogoff D., Leuko S., Harnoto R., Arakawa K., Katayama T., Kunieda T., Toyoda A., Fujiyama A. and Rothschild L.J., "Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation." *PLoS One*, 8(6), 2013, p.e64793.
- Horikawa D.D., Kunieda T., Abe W., Watanabe M., Nakahara Y., Yukuhiro F., Sakashita T., Hamada N., Wada S., Funayama T., Katagiri C., Kobayashi Y., Higashi S. and Okuda T., "Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: a new model animal of astrobiology." *Astrobiology*, 8, 2008, pp.549-556.
- Horikawa D.D., Sakashita T., Katagiri C., Watanabe M., Kikawada T., Nakahara Y., Hamada N., Wada S., Funayama T., Higashi S., Kobayashi Y., Okuda T. and Kuwabara M., "Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*." *International Journal of Radiation Biology*, 82, 2006, pp. 843-848.
- Horikawa D.D., Yamaguchi A., Sakashita T., Tanaka D., Hamada N., Yukuhiro F., Kuwahara H., Kunieda T., Watanabe M., Nakahara Y., Wada S., Funayama T., Katagiri C., Higashi S., Yokobori S., Kuwabara M., Rothschild L.J., Okuda T., Hashimoto H. and Kobayashi Y., "Tolerance of anhydrobiotic eggs of the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* to extreme environments." *Astrobiology*, 12, 2012, pp.283-289.
- Jönsson K.I., Rabbow E., Schill R.O., Harms-Ringdahl M. and Rettberg P., "Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit." *Current Biology*, 18, 2008, pp.R729-R731.
- Katayama T., Kunieda T., "Genome sequencing and assembly of anhydrobiotic extremotolerant tardigrade." *Journal of Japanese Society for Extremophiles*, 9, 2010, pp.98-105.
- Keilin D., "The problem of anabiosis or latent life: history and current concept." *Proceedings of the Royal Society London B*, 150, 1959, pp.149-191.
- Kinchin I.M., *The biology of tardigrades*. London: Portland Press, 1994, p.186.
- May R.M., Maria M. and Guimard J., "Action différentielle des rayons x et ultraviolets sur le tardigrade *Macrobiotus areolatus*, à l'état actif et desséché." *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, 98, 1964, pp.349-367.



- Ono F., Saigusa M., Uozumi T., Matsushima Y., Ikeda H., Saini N.L. and Yamashita M., “Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade.” *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69, 2008, pp.2297-2300.
- Ramløv H. and Westh P., “Cryptobiosis in the eutardigrade *Adorybiotus coronifer*: tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis.” *Zoologischer Anzeiger*, 240, 2001, pp.517-523.
- Suzuki A.C., “Life history of *Milnesium tardigradum* Doyère (Tardigrada) under a rearing environment.” *Zoological Science*, 20, 2003, pp.49-57.
- Tanaka S., Tanaka J., Miwa Y., Horikawa D.D., Katayama T., Arakawa K., Toyoda A., Kubo T. and Kunieda T., “Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic tardigrade improve osmotic tolerance of human cells.” *PLoS One*, 10, 2015, p.e0118272.
- Wang C., Grohme M.A., Mali B., Schill R.O. and Frohme M., “Towards decrypting cryptobiosis -- Analyzing anhydrobiosis in the tardigrade *Milnesium tardigradum* using transcriptome sequencing.” *PLoS One*, 9, 2014, p.e92663.
- Watanabe M., “Anhydrobiosis in invertebrates.” *Applied Entomology and Zoology*, 41, 2006, pp.15-31.
- Westh P. and Ramløv H., “Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis.” *Journal of Experimental Zoology*, 258, 1991, pp. 303-311.
- Wright J.C., “Cryptobiosis 300 years on from Van Leeuwenhoek: what have we learned about tardigrades?” *Zoologischer Anzeiger*, 240, 2001, pp.563-582.
- Yamaguchi A., Tanaka S., Yamaguchi S., Kuwahara H., Takamura C., Imajoh-Ohmi S., Horikawa D.D., Toyoda A., Katayama T., Arakawa K., Fujiyama A., Kubo T. and Kunieda T., “Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade.” *PLoS One*, 7, 2012, p.e44209.

[受付日 2015. 3. 12]