

Title	最強生物クマムシの乾眠メカニズムの解析
Sub Title	Research on the anhydrobiosis mechanisms in tardigrades
Author	田中, 冴(Tanaka, Sae) 荒川, 和晴(Arakawa, Kazuharu)
Publisher	慶應SFC学会
Publication year	2023
Jtitle	Keio SFC journal Vol.22, No.2 (2022.) ,p.178- 190
JaLC DOI	10.14991/003.00220002-0178
Abstract	クマムシは乾眠という含水量数%以下の無代謝状態になることによって、周辺環境の乾燥に耐えることができる。乾眠状態のクマムシは高圧や高線量放射線などの物理的ストレスにも耐性を示す。このような乾眠の分子機構を明らかにするために、これまで、複数種のクマムシのゲノム解析やクマムシ特異的なタンパク質の解析が進められてきた。本総説では、クマムシや他の乾眠生物を取り巻く最新の研究状況や今後の展望について紹介していく。
Notes	特集 SFCバイオの軌跡 第4章 IABから羽ばたくバイオサイエンス 招待論文：総説・レビュー論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AA11671240-00220002-0178

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：総説・レビュー論文]

最強生物クマムシの乾眠メカニズムの解析

Research on the Anhydrobiosis Mechanisms in Tardigrades

田中 冴

自然科学研究機構 生命創成探究センター特任助教

Sae Tanaka

Specially Appointed Assistant Professor, National Institutes of Natural Sciences, Exploratory Research Center on Life and Living Systems

Correspondence to: sae-tanaka@keio.jp

荒川 和晴

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科教授

自然科学研究機構 生命創成探究センター客員教授

Kazuharu Arakawa

Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

Specially Appointed Professor, National Institutes of Natural Sciences, Exploratory Research Center on Life and Living Systems

Abstract: クマムシは乾眠という含水量数%以下の無代謝状態になることによって、周辺環境の乾燥に耐えることができる。乾眠状態のクマムシは高圧や高線量放射線などの物理的ストレスにも耐性を示す。このような乾眠の分子機構を明らかにするために、これまで、複数種のクマムシのゲノム解析やクマムシ特異的なタンパク質の解析が進められてきた。本総説では、クマムシや他の乾眠生物を取り巻く最新の研究状況や今後の展望について紹介していく。

Some tardigrades can tolerate almost complete desiccation by entering an ametabolic dehydrated state, referred to as anhydrobiosis. Dehydrated tardigrades exhibit extreme tolerance against various physical stresses, such as high pressure and high doses of radiation. However, the molecular mechanism of anhydrobiosis remains largely unknown. So far, the genomes have been reported in multiple species and the functions of tardigrade-specific proteins have been analyzed *in vitro* and in human cells. In this review, we introduce the research in tardigrades and other anhydrobiotic organisms and discuss the future perspectives.

Keywords: クマムシ、乾眠、無水生命状態、オミクス解析
tardigrade, anhydrobiosis, omics analysis

1 無水生命状態とは、クマムシとは

水は生命に必要な不可欠である。すなわち、生命システムそのものが水系環境で成り立つことを前提としており、その構成要素であるタンパク質や脂質二重膜の高次構造や、各種生化学反応は水という溶媒に依存している。一方で、このような生命システムからほぼ全ての水分子を取り除きながらも生命を維持する機構が存在しており、そのような状態は無水生命状態 -Anhydrobiosis-、日本語では特に「乾眠」と呼ばれている (Keilin, 1959)。含水量数%以下の乾眠状態では、酸素や ATP の消費はほぼ完全に停止しており、生命の定義のひとつである「代謝」を欠いた状態になる。このような状態は、「潜在生命 -Cryptobiosis-」と呼ばれ、「生」とも「死」とも異なる、第3の生命状態であると考えられている。この潜在生命状態には、脱水で起こる乾眠以外にも、凍結で引き起こされる Cryobiosis (凍眠) もある。この二つは溶媒となる水がなくなるといって類似しているが、水分子がその場に留まるか否かが大きく異なっている。「生命は構造として維持されている」という概念から考えると、乾眠状態では生体構造を維持する何らかのメカニズムが存在することが想定される (Clegg, 2001)。

この乾眠状態は、乾燥への適応の一つとして進化してきたと考えられている。通常の生物は、体表面からの蒸発を防ぐことで乾燥環境に適応するが、一部の生物は脱水により乾眠状態に至ることで乾燥環境に適応している。このような乾眠状態を成立させる分子機構の解明は、水を基盤とした地球環境中の生命の構成原理に触れることができるだけでなく、乾眠状態を完全な生体保存の手本とすることで、食品や生殖細胞の乾燥保存を実現することも期待される。

本総説では、クマムシにおける乾眠状態の成立機構について、これまでの研究成果を紹介する。クマムシは緩歩動物門を構成する微小の無脊椎動物であり、現在までに1400種ほどが記載されている (Degma & Guidetti, 2022)。陸地、湖沼、海など様々な環境に生息しており、深海や極地でも観察されている。体長は0.2～1 mmほどで、4対の脚をもつ(図1)。神経系と筋肉系が全身に張り巡らされており、脳、中腸、生殖器などの器官をもつ。メスのみで単為生殖をおこなう種、雌雄同体の種、オス・メスで有性生殖する種、ま

たはその両方が確認されている種が知られている (Sugiura & Matsumoto, 2021)。また、乾眠状態のクマムシは極限的な物理的・化学的条件にも耐えることができる。例えば、絶対零度に近い超低温 (Becquerel, 1950)、7.5 GPa までの高圧 (Ono et al., 2008)、真空 (Horikawa et al., 2012)、紫外線 (Horikawa et al., 2013)、高線量放射線 (Horikawa et al., 2006; May et al., 1964) やアルコールなどの有機溶媒 (Ramlov & Westh, 2001) に曝露されても、給水後に復活することができる。このように通常の生き物では耐えることのできない環境条件にも耐えうるため、乾眠状態は「生命」ではなくもはや「物質」と言い表される。

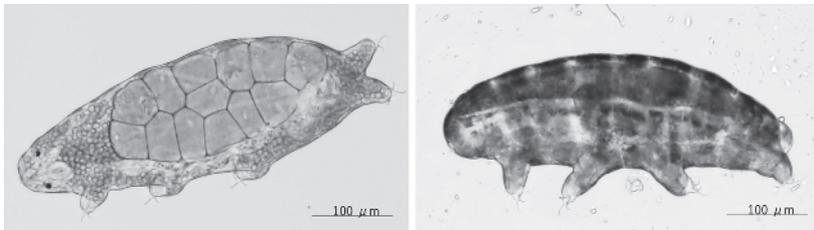


図1 クマムシ

ヤマクマムシ (左) とヨコヅナクマムシ (右)。左側が頭部。ヤマクマムシにおいては発達した卵巣内に複数の卵が確認される。2022年 田中撮影。



図2 クマムシの系統樹

緩歩動物門は真クマムシ綱と異クマムシ綱に分けられる。さらに真クマムシ綱はハナレヅメ目とヨリヅメ目に、異クマムシ綱はトゲクマムシ目とフシクマムシ目に分けられる。

2 乾眠状態の基盤—クマムシゲノムと発現誘導解析

これまでにクマムシのゲノムは複数種において解読されているが、ここでは真クマムシ綱ヨリヅメ目に属している二種、ヨコヅナクマムシとヤマクマムシのゲノムについて説明する(図1・2)。両種共に飼育系が確立しており(Gabriel et al., 2007; Horikawa et al., 2008; Roszkowska et al., 2021)、大量のサンプルを必要とするオミクス解析や高い再現性が要求される生化学的な実験にも対応が可能である。この二種の最も重要な違いは、乾眠状態になるための準備期間が必要か否かである。ヨコヅナクマムシは急激な乾燥に耐えることができる一方で、ヤマクマムシは比較的ゆっくりと環境の湿度を下げなくては乾眠状態になることができない。実験室内では、相対湿度95%の環境に2日間静置するという処理をおこなうことで乾眠状態を可能としている(Kondo et al., 2015, 2019, 2020)。またこの期間に転写・翻訳の阻害剤を加えると乾眠状態に至ることができずに環境の乾燥に耐えることができなくなることも報告されている。このことから、ヤマクマムシでは乾眠に関わる遺伝子産物の準備期間が必須であることが示唆される。

これら二種のクマムシのゲノムサイズは、ヨコヅナクマムシが56Mbp、ヤマクマムシが104Mbpと、約二倍の違いがみられた(Hashimoto et al., 2016; Yoshida et al., 2017)。しかし、この違いはゲノムの倍化によるものではなく、ヨコヅナクマムシにおけるイントロン領域の縮小などによると考えられている。また、二種の遺伝子構成には大きな差はみられず、多くのクマムシ特異的な遺伝子ファミリーや抗酸化経路の遺伝子ファミリーが拡張しているという傾向が確認された。さらに、乾眠移行期の遺伝子発現解析においては、ヨコヅナクマムシがほとんど発現変動する遺伝子がみられない一方で、ヤマクマムシでは乾燥に伴い発現上昇する遺伝子が多くみられ、二種間で大きな違いがみられた。先行研究から推測されていたように、ヤマクマムシにおいて準備期間が必要な理由が、乾眠状態への移行に必要な遺伝子産物の転写翻訳にあることを裏付ける証拠であるといえる。遺伝子発現の調節領域についての研究は現在進行中であるが、おそらくヤマクマムシのプロモーター領域には乾燥を感知して転写をオンにする仕組みがあると考えられ、これも二種間でゲノムサイズに大きな違いがある理由の一つと考えられる。また、ヨコヅ

ナクマムシは保護対象である DNA の絶対量を減らすことで、ダメージによる変異のリスクと保護物質常時発現のコストを削減している可能性も考えられる。

このような乾眠状態への移行の違いは生息域の乾燥頻度によると考えられている。実際に、ヨコヅナクマムシは道路脇のコケから、ヤマクマムシは湖沼から採取された。また、海に生息するクマムシ系統（フシクマムシ目）においては乾眠状態への移行はみられず、ヨリヅメ目であっても淡水生種の一部は乾眠状態にはならない。このように、乾眠状態になる種は緩歩動物門の中に複数系統確認されており、生息域依存的に消失と獲得が複数回起きた可能性が考えられている（図 2）。このようなドラスティックな進化の要因のひとつとして、遺伝子の水平伝播による新規遺伝子の獲得が関わることが想定されていた（Boothby et al., 2015）。いくつかの遺伝子において後生動物よりも菌類や細菌類に遺伝相同性が高いものがみられ、その結果として環境変動への耐性を獲得している可能性も示唆されている。しかしながら、ゲノム全体での水平伝播遺伝子の割合は他の生物と同程度であり、乾眠状態への移行を可能にした主要因とは言い難い（Arakawa, 2016; Koutsovoulos et al., 2016）。もう一つの進化要因として考えられるのは、天然変性タンパク質と乾眠による DNA ダメージがもたらす変異の蓄積である。天然変性タンパク質は一般的な酵素などと異なり、機能的な構造をもたないタンパク質の総称である。現在では様々な天然変性タンパク質が生物界に広く存在することが知られており、環境変化に応答して機能することがわかってきている。このような天然変性タンパク質は無水生命状態へ移行するクマムシ以外の生物種にも多く発現しており、急激な細胞内環境変化に対応している可能性が考えられている。このような天然変性タンパク質は特定の構造をもたないことから、遺伝子としての配列保存性が低い傾向がある。また、乾眠状態の生物において DNA ダメージが検出されていることから（Gusev et al., 2010; Hespels et al., 2014; Neumann et al., 2009）、乾眠を経ることによって遺伝子変異が生じる可能性が考えられる。これらのことから、乾眠という特殊な条件において天然変性タンパク質が爆発的に進化し、その結果としてヨコヅナクマムシのような乾眠生物が出現した可能性を考えることもできる。このような進化を想定させ

る遺伝子進化として、Dsup (Damage Suppressor) という核局在性の天然変性タンパク質が挙げられる (Hashimoto et al., 2016; Hashimoto & Kunieda, 2017)。Dsup はヨコヅナクマムシにおいて初めて同定されたが、近縁のヤマクマムシからは相同配列を持つ遺伝子は見出されなかった。その後、ゲノム構造の解析から、ヤマクマムシの Dsup が同定されたが、それら二種間の遺伝子の配列保存性は極めて低く、乾眠能力を持つ種のゲノム進化には他の生物種では見られないような要因が働いている可能性が示唆された。

3 乾眠状態を可能にする分子機構

乾眠状態への移行はクマムシ以外でもいくつかの動物種、ニセネグサレセンチュウ、ネムリユスリカなどでも研究がおこなわれている。これらの乾眠状態の個体においてはトレハロースという非還元性の二糖が乾燥重量の15%程度まで蓄積することが知られている (Madin & Crowe, 1975; Watanabe et al., 2002)。トレハロースはガラス化や水分子との置換を起こすことによって、乾眠状態におけるタンパク質や脂質二重膜の構造の維持に関与していると考えられている (Crowe et al., 1984)。また、植物などでもこのような低分子化合物の蓄積がみられており、同様の役割を担っていると考えられている。一方で、クマムシではトレハロースの顕著な蓄積はみられず、ゲノム解析からもトレハロース合成経路の一部を欠いていることが示されている (Hengherr et al., 2008; Westh & Ramløv, 1991; Yoshida et al., 2017)。*Paramacrobiotus metropolitanus* ではトレハロースの蓄積が観察されているが、他の動物に比べるとその量は少なく、クマムシの乾燥耐性にトレハロースがどの程度貢献しているのかはいまだ不明確である (Hara et al., 2021)。また、トレハロースは乾眠状態からの復帰後のエネルギー源としても役割があると考えられており、グルコースなどの還元性糖類の反応性を抑えるための適切な保存状態として用いられている可能性もある。このように複数の役割があると考えられることから、トレハロースの乾眠状態における必要性についてはまだ議論の余地があるといえる。

トレハロース以外に乾眠に関わるタンパク質として、LEA タンパク質が挙げられる。LEA タンパク質は植物の種子において総タンパク質量の4%程度

を占めるタンパク質として同定されたことから Late embryogenesis abundant と名付けられた (Cuming, 1999; Roberts et al., 1993)。それ以降、複数の乾眠動物から見つかっており、乾眠との関わりが強く示唆されてきた。一方、クマムシでは LEA タンパク質の代わりに、CAHS、SAHS、MAHS などの熱処理によって凝集形成しない熱可溶性という性質をもつタンパク質が同定された (Cytoplasmic, Secretory, Mitochondrial Abundant Heat Soluble) (S. Tanaka et al., 2015; Yamaguchi et al., 2012)。これらのタンパク質は細胞質、細胞外分泌、ミトコンドリアとそれぞれ細胞内局在に違いがあり、かつ、前述の Dsup が核内で DNA 保護を担うと考えられていることを併せて、それぞれのタンパク質が細胞の各所に配置されることによって細胞を守っている可能性が考えられている。2021 年から、CAHS の高次構造に関する論文が複数の研究室から発表されている (Yagi-Utsumi et al., 2021; Malki et al., 2021; Veling et al., 2022; Hesgrove et al., 2021; Tanaka et al., 2021)。CAHS は通常の液性環境では非構造であるが、トリフルオロエタノール (TFE) などによりタンパク質周囲の水分子を取り除くと α ヘリックスを形成することが円二色性 (CD) 解析により示されている。さらに、通常的环境でも CAHS タンパク質を高濃度にしておくと、ゲルのように凝固することがわかった。また、CAHS タンパク質を発現するヒト培養細胞を高浸透圧ストレスに曝すと、CAHS タンパク質が細胞内で凝集体や繊維のような構造をとることも示されている。このような高次構造と乾眠との関連ははまだ不明だが、細胞内で高次構造を形成することで細胞の構造が壊れるのを防いでいるという仮説は前述の LEA タンパク質でも提案されており (Tunnacliffe et al., 2005)、乾眠生物における共通の防御機構である可能性が考えられる。CAHS に対する RNAi により周辺環境の乾燥への耐性が減弱することや (Boothby et al., 2017)、MAHS 発現細胞において高浸透圧耐性が向上することから (Tanaka et al., 2015)、これらのクマムシ特異的なタンパク質がストレス応答に関わっている可能性は示唆されているが、実際にクマムシの乾眠においてどのような挙動を示すかはわかっていない。

乾眠生物に特異的なタンパク質だけでなく、生物が共通に有している機構も乾眠では重要な要素になっていると考えられている。その一つが抗酸化経

路である。脱水に伴い、抗酸化に関わるタンパク質 SOD やカタラーゼの発現が有意に上昇することがクマムシだけではなく、他の乾眠生物からも複数報告されている (Gusev et al., 2010; Rizzo et al., 2010)。前述のように、クマムシのゲノムにおいても遺伝子ファミリーの拡張がみられるなど、抗酸化経路の拡充が乾眠を成立させる基盤となっていることがうかがえる (Yoshida, et al., 2022)。このような抗酸化ストレスへの備えからは、乾眠時に酸化ストレスが発生することが想定されるが、これまでに酸化ストレスがどのように生じるのかは明らかにされていない。おそらく、活性酸素種の主な発生源であるとされるミトコンドリアの膜障害が生じるか、通常の抗酸化系の効力が低下するかで、一時的に細胞内の酸化ストレスが高まるのではないかと推測される。また、HSP や DNA 修復経路も同様に発現上昇することから (Gusev et al., 2011; Yoshida et al., 2017)、乾眠時の保護機構は完璧なものではなく修復する基盤と共に成立していると考えるのが妥当である。一方で、給水によって乾眠から復帰する際に発現誘導がみられる修復関連遺伝子もいくつか報告されており、これらはダメージを感知することで誘導されていると考えられる (Schill et al., 2004)。それら遺伝子発現のシステムが明らかになることによって、どこまでが乾眠機構としてプログラムされているのかといった乾眠機構の全体像が明らかになることが期待される。

4 今後の展望

4.1 拡大するゲノム比較解析

ゲノム解読技術は日進月歩の勢いで発展している。この恩恵はクマムシゲノム解読にもあらわれており、ヤマクマムシのゲノムが世界の複数の研究室から報告されたのち、現在までにヨコヅナクマムシ、トゲクマムシ、オニクマムシなどのゲノムが公開されている (Arakawa, 2022; Hashimoto et al., 2016; Murai et al., 2021; Yoshida et al., 2017; Bemm et al., 2017)。緩歩動物門を網羅するには至っていないが、これらのデータは動物門独自の形態的進化や複数回にわたる乾眠機構の獲得・消失についてさらなる考察を可能にしている。いくつかのクマムシ特異的なタンパク質は真クマムシ綱ヨリヅメ目内で獲得された可能性が示唆されており、同じ綱のハナレヅメ目ではみられ

ない。また、同様に他の乾眠生物であるネムリユスリカ、ワムシ、センチュウなどのゲノムも順次公開されており、動物門を跨いだ比較解析も期待される (Gusev et al., 2014; Vakhrusheva et al., 2020; Wan et al., 2021; Yoshida & Tanaka, 2022)。乾眠機構は、無脊椎動物においても散発的に存在しており、複数の独立したシステムが存在していると考えられる。種間のオーソログやアナログを同定することによって、乾眠機構がどのように達成され得るのかが明らかになるだろう。

4.2 クマムシにおける新規の実験系

どのようなパーツが乾眠機構に必要であるかは、ゲノム解析によって明らかになってくるだろう。一方で、それらのパーツがどのように乾眠機構を達成するかを明らかにするためには、個々のタンパク質や細胞内・個体内での挙動の解析が必要になってくる。MAHS や Dsup の導入によりヒト培養細胞に耐性を付与することに成功しているが、それらの乾眠における役割はほとんどわかっていない。今後はこのような乾眠機構の再構築をヤマクマムシのような誘導必須な種においておこなう必要がでてくるだろう。そのためにも、CRSPR/Cas9 を用いたトランスジェニックなどの遺伝子改変体の作成法の確立が望まれる。現在、筆者らのグループでは、クマムシ細胞内における *in vivo* 発現系の構築に成功し、クマムシ細胞内でのタンパク質挙動についての解析をおこなっている (S. Tanaka et al., 2023)。乾眠は生命の物質化という、生物学の領域から逸脱した状態ではあるが、このような新規の実験系を構築していくことで、乾眠機構の分子基盤が少しずつ明らかになっていくことだろう。

4.3 乾眠と休眠

はじめにも述べたように、乾眠は周辺環境の乾燥に伴い生じる無代謝状態である。乾眠によく似た休眠をおこなう生物も知られており、これらの混同は乾眠状態についての考察を誤らせる可能性がある。乾燥による休眠は完全な代謝の停止を伴わないため、トレハロースの分解やさらなる相対湿度の低下によって生存率が急激に低下することが観察されている (Erkut et al.,

2011; Tapia & Koshland, 2014)。このような休眠状態においても個体の含水量は低下しているが、どのように代謝を低下させた状態で維持しているのかは不明である。乾眠と休眠を適切に区別し、比較することで、生命システムが水の欠乏に対してどのような戦略を取りうるのかが明らかになっていくことが期待される。

引用文献

- Arakawa, K. (2016) “No evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade [Review of No evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade]”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113(22), E3057.
- Arakawa, K. (2022) “Examples of Extreme Survival: Tardigrade Genomics and Molecular Anhydrobiology”, *Annual Review of Animal Biosciences*. 10, pp. 17-37.
- Bequerel, P. (1950) “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 élevé”, *C R Hebd Seance Acad Sci Paris*. 231, pp. 261-264.
- Bemm, F., Burleigh, L., Förster, F., Schmucki, R., Ebeling, M., et al. (2017) “Draft genome of the Eutardigrade Milnesium tardigradum sheds light on ecdysozoan evolution”, *bioRxiv*. 122309. <https://doi.org/10.1101/122309>
- Boothby, T. C., Tapia, H., Brozena, A. H., Piszkiwicz, S., Smith, A. E., et al. (2017) “Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation”, *Molecular Cell*. 65(6), pp. 975-984.e5.
- Boothby, T. C., Tenlen, J. R., Smith, F. W., Wang, J. R., Patanella, K. A., et al. (2015) “Evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(52), pp. 15976-15981.
- Clegg, J. S. (2001) “Cryptobiosis — a peculiar state of biological organization”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 128(4), pp. 613-624.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984) “Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose”, *Science*. 223(4637), pp. 701-703.
- Cuming, A. C. (1999) “LEA Proteins”, *Seed Proteins*. pp. 753-780.
- Degma, P., & Guidetti, R. (2022) “Actual checklist of Tardigrada species (2009-2022, 41th Edition: 16-05-2022)”, *Retrieved June. 1, 2022*, from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.719.6772>
- Erkut, C., Penkov, S., Khesbak, H., Vorkel, D., Verbavatz, J.-M., et al. (2011) “Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation”, *Current Biology*. CB, 21(15), pp.1331-1336.
- Gabriel, W. N., McNuff, R., Patel, S. K., Gregory, T. R., Jeck, W. R., et al. (2007) “The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development”, *Developmental Biology*. 312(2), pp. 545-559.
- Gusev, O., Cornette, R., Kikawada, T., & Okuda, T. (2011) “Expression of heat shock protein-

- coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid Polypedium vanderplanki”, *Cell Stress and Chaperones*. 16(1), pp. 81-90.
- Gusev, O., Nakahara, Y., Vanyagina, V., Malutina, L., Cornette, R., et al. (2010) “Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance”, *PLoS One*. 5(11), e14008.
- Gusev, O., Suetsugu, Y., Cornette, R., Kawashima, T., Logacheva, M. D., et al. (2014) “Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge”, *Nature Communications*. 5, 4784.
- Hara, Y., Shibahara, R., Kondo, K., Abe, W., & Kunieda, T. (2021) “Parallel evolution of trehalose production machinery in anhydrobiotic animals via recurrent gene loss and horizontal transfer”, *Open Biology*. 11(7), 200413.
- Hashimoto, T., Horikawa, D. D., Saito, Y., Kuwahara, H., Kozuka-Hata, H., et al. (2016) “Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein”, *Nature Communications*. 7, 12808.
- Hashimoto, T., & Kunieda, T. (2017) “DNA Protection Protein, a Novel Mechanism of Radiation Tolerance: Lessons from Tardigrades”, *Life*. 7(2). <https://doi.org/10.3390/life7020026>
- Hengherr, S., Heyer, A. G., Köhler, H.-R., & Schill, R. O. (2008) “Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades—evidence for divergence in responses to dehydration”, *The FEBS Journal*. 275(2), pp. 281-288.
- Hesgrove, C. S., Nguyen, K. H., Biswas, S., Childs, C. A., Shradha, K. C., et al. (2021) “Tardigrade CAHS Proteins Act as Molecular Swiss Army Knives to Mediate Desiccation Tolerance Through Multiple Mechanisms”, *bioRxiv*. 2021.08.16.456555. <https://doi.org/10.1101/2021.08.16.456555>
- Hespeels, B., Knapen, M., Hanot-Mambres, D., Heuskin, A.-C., Pineux, F., et al. (2014) “Gateway to genetic exchange? DNA double-strand breaks in the bdelloid rotifer Adineta vaga submitted to desiccation”, *Journal of Evolutionary Biology*. 27(7), pp. 1334-1345.
- Horikawa, D. D., Cumbers, J., Sakakibara, I., Rogoff, D., Leuko, S., et al. (2013) “Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade Ramazzottius varieornatus and Hypsibius dujardini after exposure to UVC radiation”, *PLoS One*. 8(6), e64793.
- Horikawa, D. D., Kunieda, T., Abe, W., Watanabe, M., Nakahara, Y., et al. (2008) “Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade Ramazzottius varieornatus: a new model animal for astrobiology”, *Astrobiology*. 8(3), pp. 549-556.
- Horikawa, D. D., Sakashita, T., Katagiri, C., Watanabe, M., Kikawada, T., et al. (2006) “Radiation tolerance in the tardigrade Milnesium tardigradum”, *International Journal of Radiation Biology*. 82(12), pp. 843-848.
- Horikawa, D. D., Yamaguchi, A., Sakashita, T., Tanaka, D., Hamada, N., et al. (2012) “Tolerance of anhydrobiotic eggs of the Tardigrade Ramazzottius varieornatus to extreme environments”, *Astrobiology*. 12(4), pp. 283-289.
- Keilin, D. (1959) “The problem of anabiosis or latent life: history and current concept”, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society*. 150(939), pp. 149-191.
- Kondo, K., Kubo, T., & Kunieda, T. (2015) “Suggested Involvement of PP1/PP2A Activity and De Novo Gene Expression in Anhydrobiotic Survival in a Tardigrade, Hypsibius dujardini, by Chemical Genetic Approach”, *PLoS One*. 10(12), e0144803.
- Kondo, K., Mori, M., Tomita, M., & Arakawa, K. (2019) “AMPK activity is required for the induction of anhydrobiosis in a tardigrade Hypsibius exemplaris, and its potential up-regulator is PP2A”, *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*. 24(12),

- pp. 768-780.
- Kondo, K., Mori, M., Tomita, M., & Arakawa, K. (2020) "Pre-treatment with D942, a furancarboxylic acid derivative, increases desiccation tolerance in an anhydrobiotic tardigrade *Hypsibius exemplaris*", *FEBS Open Bio.* 10(9), pp. 1774-1781.
- Koutsouvolos, G., Kumar, S., Laetsch, D. R., Stevens, L., Daub, J., et al. (2016) "No evidence for extensive horizontal gene transfer in the genome of the tardigrade *Hypsibius dujardini* [Review of No evidence for extensive horizontal gene transfer in the genome of the tardigrade *Hypsibius dujardini*]", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 113(18), pp. 5053-5058.
- Madin, K. A. C., & Crowe, J. H. (1975) "Anhydrobiosis in nematodes: Carbohydrate and lipid metabolism during dehydration", *The Journal of Experimental Zoology.* 193(3), pp. 335-342.
- Malki, A., Teulon, J.-M., Camacho Zarco, A., Chen, S.-W. W., Adamski, W., et al. (2021) "Intrinsically Disordered Tardigrade Proteins Self-Assemble into Fibrous Gels in Response to Environmental Stress", *Angewandte Chemie.* <https://doi.org/10.1002/anie.202109961>
- May, R. M., Maria, M., & Gumard, J. (1964) "Action différentielle des rayons x et ultraviolets sur le tardigrade *Macrobiotus areolatus*, a l'état actif et desséché", *Bulletin Biologique de La France et de La Belgique.* 98, pp. 349-367.
- Murai, Y., Yagi-Utsumi, M., Fujiwara, M., Tanaka, S., Tomita, M., et al. (2021) "Multiomics study of a heterotardigrade, *Echiniscus testudo*, suggests the possibility of convergent evolution of abundant heat-soluble proteins in Tardigrada", *BMC Genomics.* 22(1), 813.
- Neumann, S., Reuner, A., Brümmer, F., & Schill, R. O. (2009) "DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades", *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology.* 153(4), pp. 425-429.
- Ono, F., Saigusa, M., Uozumi, T., Matsushima, Y., Ikeda, H., et al. (2008) "Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade", *The Journal of Physics and Chemistry of Solids.* 69(9), pp. 2297-2300.
- Ramløv, H., & Westh, P. (2001) "Cryptobiosis in the Eutardigrade *Adorybiotus* (Richtersius) coronifer: Tolerance to Alcohols, Temperature and de novo Protein Synthesis", *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology.* 240(3), pp. 517-523.
- Rizzo, A. M., Negroni, M., Altiero, T., Montorfano, G., Corsetto, P., et al. (2010) "Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*", *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology.* 156(2), pp. 115-121.
- Roberts, J. K., DeSimone, N. A., Lingle, W. L., & Dure, L., 3rd. (1993) "Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos", *The Plant Cell.* 5(7), pp. 769-780.
- Roszkowska, M., Wojciechowska, D., Kmita, H., Cerbin, S., Dziuba, M. K., et al. (2021) "Tips and tricks how to culture water bears: simple protocols for culturing eutardigrades (Tardigrada) under laboratory conditions", *The European Zoological Journal.* 88(1), pp. 449-465.
- Schill, R. O., Steinbrück, G. H. B., & Köhler, H.-R. (2004) "Stress gene (hsp70) sequences and quantitative expression in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada) during active and cryptobiotic stages", *The Journal of Experimental Biology.* 207(Pt 10), pp. 1607-1613.
- Sugiura, K., & Matsumoto, M. (2021) "Sexual reproductive behaviours of tardigrades: a review", *Invertebrate Reproduction & Development.* 65(4), pp. 279-287.
- Tanaka, A., Nakano, T., Watanabe, K., & Masuda, K. (2021) "Stress-dependent dynamic and

- reversible formation of cytoskeleton-like filaments and gel-transition by tardigrade tolerance proteins”, *bioRxiv*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.02.462891.abstract>
- Tanaka, S., Tanaka, J., Miwa, Y., Horikawa, D. D., Katayama, T., et al. (2015) “Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic Tardigrade improve osmotic tolerance of human cells”, *PLoS One*. 10(2), e0118272.
- Tanaka, S., Aoki, K., & Arakawa, K., (2023) “In vivo expression vector derived from anhydrobiotic tardigrade genome enables live imaging in Eutardigrada”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, in press.
- Tapia, H., & Koshland, D. E. (2014) “Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance”, *Current Biology*. CB, 24(23), pp. 2758-2766.
- Tunnacliffe, A., Lapinski, J., & McGee, B. (2005) “A Putative LEA Protein, but no Trehalose, is Present in Anhydrobiotic Bdelloid Rotifers”, *Hydrobiologia*. 546(1), pp. 315-321.
- Vakhrusheva, O. A., Mnatsakanova, E. A., Galimov, Y. R., Neretina, T. V., Gerasimov, E. S., et al. (2020) “Genomic signatures of recombination in a natural population of the bdelloid rotifer *Adineta vaga*”, *Nature Communications*. 11(1), 6421.
- Veling, M. T., Nguyen, D. T., Thadani, N. N., Oster, M. E., Rollins, N. J., et al. (2022) “Natural and Designed Proteins Inspired by Extremotolerant Organisms Can Form Condensates and Attenuate Apoptosis in Human Cells”, *ACS Synthetic Biology*. 11(3), pp. 1292-1302.
- Wan, X., Saito, J. A., Hou, S., Geib, S. M., Yuryev, A., et al. (2021) “The *Aphelenchus avenae* genome highlights evolutionary adaptation to desiccation”, *Communications Biology*. 4(1), 1232.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F., & Okuda, T. (2002) “Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures”, *The Journal of Experimental Biology*. 205(18), pp. 2799-2802.
- Westh, P., & Ramløv, H. (1991) “Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis”, *The Journal of Experimental Zoology*. 258(3), pp. 303-311.
- Yagi-Utsumi, M., Aoki, K., Watanabe, H., Song, C., Nishimura, S., et al. (2021) “Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade”, *Scientific Reports*. 11(1), pp. 1-9.
- Yamaguchi, A., Tanaka, S., Yamaguchi, S., Kuwahara, H., Takamura, C., et al. (2012) “Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade”, *PLoS One*. 7(8), e44209.
- Yoshida, Y., Koutsovoulos, G., Laetsch, D. R., Stevens, L., Kumar, S., et al. (2017) “Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*”, *PLoS Biology*. 15(7), e2002266.
- Yoshida, Y., Satoh, T., Ota, C., Tanaka, S., Horikawa, D. D., et al. (2022) “Time-series transcriptomic screening of factors contributing to the cross-tolerance to UV radiation and anhydrobiosis in tardigrades”, *BMC Genomics*. 23(1), p. 405.
- Yoshida, Y., & Tanaka, S. (2022) “Deciphering the Biological Enigma—Genomic Evolution Underlying Anhydrobiosis in the Phylum Tardigrada and the Chironomid *Polypedilum vanderplanki*”, *Insects*. 13(6), 557.

[受付日 2022. 6. 29]