

Title	高感度リン酸化プロテオーム解析システムによるクマムシの乾眠移行メカニズムの解明
Sub Title	
Author	長谷部, 百合子(Hasebe, Yuriko)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2013
Jtitle	生命と情報 No.20 (2013.) ,p.84- 94
JaLC DOI	
Abstract	<p>クマムシは極限環境下で驚異的なストレス耐性を持つ。乾燥環境下では体内の水分を低下させ、丸い樽の形状(Tun状態)をとる。乾眠を行う生物種は乾眠移行に時間を有するものが多く、水の代わりに生体成分などを保護するためトレハロースやLEAタンパク質などを大量に合成し、高い乾燥耐性能力を獲得している。しかし、ヨコツナクマムシ(Ramazzottius varieornatus)はmRNAレベルの遺伝子発現において活性状態と乾燥状態で差異がみられずトレハロースの蓄積がない。これらにより、タンパク質の発現制御よりも、翻訳後修飾によって乾眠状態に移行していることが推測される。同種のHypsibius dujardini(ドウジャルダンヤマクマムシ)は弱いながらも乾燥耐性を持つ事が報告され、R. varieornatusに比べ飼育効率が良く細胞系譜が明らかである。そこで本研究では、H. dujardiniが乾眠状態に移行する際に、どのタンパク質のどの部位のリン酸化が変動しているかを定量的かつ経時的に把握するために乾燥応答のシグナル伝達経路の解明することが目的である。乾眠移行時のリン酸化プロテオームの経時変化を見るには多検体の測定が必要だが、クマムシの試料数の確保が困難であることから、微量試料でリン酸化プロテオーム解析を確立する必要がある。そのためH. dujardiniの測定法を安定させるために前処理のステップと測定ステップで検討し乾眠移行の経時的なリン酸化プロテオームデータを取得した。リン酸化部位を280個同定し、経時的に増加していくタンパク質を6個、減少していくタンパク質を4個得ることが出来た。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2013年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000020-0084

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.

高感度リン酸化プロテオーム解析システムによるクマムシの 乾眠移行メカニズムの解明

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 修士2年
長谷部 百合子

論文要旨

クマムシは極限環境下で驚異的なストレス耐性を持つ。乾燥環境下では体内の水分を低下させ、丸い樽の形状（Tun状態）をとる。乾眠を行う生物種は乾眠移行に時間を有するものが多く、水の代わりに生体成分などを保護するためトレハロースやLEAタンパク質などを大量に合成し、高い乾燥耐性能力を獲得している。しかし、ヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) はmRNAレベルの遺伝子発現において活性状態と乾燥状態で差異がみられずトレハロースの蓄積がない。これらにより、タンパク質の発現制御よりも、翻訳後修飾によって乾眠状態に移行していることが推測される。同種の*Hypsibius dujardini* (ドウジャルダンヤマクマムシ) は弱いながらも乾燥耐性を持つ事が報告され、*R. varieornatus* に比べ飼育効率が良く細胞系譜が明らかである。そこで本研究では、*H. dujardini*が乾眠状態に移行する際に、どのタンパク質のどの部位のリン酸化が変動しているかを定量的かつ経時的に把握するために乾燥応答のシグナル伝達経路の解明することが目的である。乾眠移行時のリン酸化プロテオームの経時変化を見るには多検体の測定が必要だが、クマムシの試料数の確保が困難であることから、微量試料でリン酸化プロテオーム解析を確立する必要がある。そのため*H. dujardini*の測定法を安定させるために前処理のステップと測定ステップで検討し乾眠移行の経時的なリン酸化プロテオームデータを取得した。リン酸化部位を280個同定し、経時的に増加していくタンパク質を6個、減少していくタンパク質を4個得ることが出来た。

Keywords：クマムシ, ドウジャルダンヤマクマムシ, 乾眠,
リン酸化プロテオミクス, 高感度分析システム

1. 序論

1.1. クマムシの極限環境耐性

クマムシは無脊椎動物で緩歩動物門を形成し、海洋や陸生等の様々な環境下に生息し1000種類以上が存在 (Guidetti and Bertolani, 2005; Guil and Cabrero-Sañudo, 2007) する。クマムシは極限環境下でクリプトビオシスと呼ばれる無代謝の休眠状態になり、絶対零度から摂氏100度 (Hengherr, et al., 2009) までの温度変化、真空から7万5000気圧までの圧力 (Seki and Toyoshima, 1998), 10 kJ/m² 以上のUV照射 (Altiero, et al., 2011), 7000GyのX線 (Jönsson, 2007) などの環境においても高い耐性能力を示す。また、クリプトビオシスが起きるストレス要因より大きく4種類のクリプトビオシスに分けられ、乾燥ストレスにより乾眠、酸素欠乏による窒息仮死、低温による凍眠 (Guidetti, et al., 2011), 高浸透圧による塩眠がある。陸生のクマムシは乾燥ストレスがかかるとTun状態という樽の様な形態になり3%以下まで水分を低下する (Westh, et al., 1991; Horikawa, et al., 2006; Horikawa, et al., 2008)。さらにTun状態となった *Richtersius coronifer* と *Milnesium tardigradum* は、真空・太陽放射・超低温という宇宙空間への曝露から生還できることが動物としては初めて確認されている (Jönsson, et al., 2008)。通常、乾燥耐性力のある生物は極限環境下において水の代わりに生体成分を保護するグルコースをトレハロースに作り替え (Oliver, et al., 2001; Crowe, et al., 2002; Crowe, et al., 2007; Hengherr, et al., 2008; Schill, et al., 2008) Late embryogenesis abundant (LEA) タンパク質を大量に合成し (Kikawada, et al., 2006; Schokraie, et al., 2010) 高い乾燥耐性能力を獲得している。近年、新たにCytoplasmic 細胞質型熱安定性タンパク質 (Abundant Heat Soluble, CAHS) と分泌型熱安定性タンパク質 (Secretory Abundant Heat Soluble, SAHS) がクマムシの中で高い耐性能力をもつ *Ramazzottius varieornatus* (ヨコヅナクマムシ; *R.varieornatus*) において同定された。また、乾燥耐性を示すネムリユスリカの幼虫も軽いDNA損傷を受ける (Neumann, et al., 2009) もの乾燥重量あたり約5-20%のトレハロースを蓄積し (Clegg, 1962; Watanabe, et al., 2002; Watanabe, et al., 2004) トレハロースを人為的に増加させると放射線耐性能力を高めた (Watanabe, et al., 2007)。ところが、クマムシは乾燥重量あたり約2.3%しかトレハロースを蓄積していない (Westh and Ramløv, 1991; Hengherr, 2008; Jönsson and Persson, 2010)。そのためTun状態になるメカニズムとして代謝産物だけでなく、耐性を担う遺伝子や機能に着目する必要があると考えられる。また、クリプトビオシスの一例である乾眠を行う生物種は完全に乾眠するまで数十時間と長時間を有するものが多いが、*R.varieornatus* は約30分で乾眠に移行し、mRNAレベルの遺伝子発現において活性状態とTun状態で差異がみられない。この乾燥移行時の短さにより、タンパク質の発現制御よりも、翻訳後修飾によってクリプトビオシスに移行していることが推測される。これまでクマムシに効率的な飼育系が存在しなかったため、クリプトビオシスの網羅的な分子メカニズムの理解は限定的であった。近年堀川らにより *R.varieornatus* の飼育法を確立し (Horikawa, et al., 2008), 2009年12月に國枝らによって同種のドラフトゲノム配列が解読された事により、ゲノム解析手法を用いて *R.varieornatus* の極限環境耐性メカニズムにアプローチすることが可能となってきた。しかしながら、*R.varieornatus* は飼育に大変な労力がかかり繁殖能が低い飼育効率も低くクマムシのモデル対象生物には適していない。一方、*Hypsibius dujardini* (ドウジャールダンヤマクマムシ) は世代時間が約14日、孵化するまで約4日であり飼育効率が高くゲノムサイズが約7Mbpである (Gabriel, et al., 2007)。主に発生や進化生物学において注目され (Gabriel and Goldstein, 2007; Baven, et al., 2009), クマムシの中でもモデル生物として扱われるようになってきた。更に *H. dujardini* は今まで乾燥耐性がないと思われていたが *R.varieornatus* に比べ乾燥耐性は低いものの耐性能力があることがわかってきた (Horikawa, et al., 2013)。そこで本研究では *H. dujardini* が乾眠状態に移行する際に、どのタンパク質のどの部位のリン酸化が変動しているかを定量的かつ経時的に把握するためにクマムシの乾燥応答のシグナル伝達経路の解明に迫るためにタンパク質の翻訳後修飾や細胞内シグナル伝達を行う一つの手段として連続的なスイッチの切り替えを行うのに重要な役割をもつプロテオームリン酸化に着目し、クマムシの乾眠移行における網羅的なプロテオーム解析及びリン酸化解析を行う。

2. 手法

3.2.1. 実験概要

クマムシの乾眠移行時の経時的な変化の基盤となる前処理法および微量試料の分析手法を確立し、クマムシのActive状態・Tun状態のホールプロテオームデータ及びリン酸化プロテオームデータを取得した。定量法としてiTRAQ法やTMT法が主流で使われているが、iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) 法とTMT (Tandem Mass Tag) 法はレポーターイオンを測定する必要がありその場合は通常のイオントラップで使用する衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation, CID) 法ではレポーターイオンを測定できないため、HCD (High collision dissociation) 法に変える必要がある。HCD法の場合、MS/MSをOrbitrapで行うのでスキャンに時間がかかり、同定数は大幅に落ちる。測定をした際に対象とするペプチドがある検体によって同定されていたり、されていなかったりすることがあるため、同定されていないデータでは定量値が欠けてしまうというデメリットがある。一方で、ジメチルラベルを使用する場合は、2群間比較のため検体数が増えトータル5万匹を使用した場合に1検体の試料量を減らす・最低限のタイムポイント測定になってしまう。これらのメリット・デメリットを踏まえた上でノンラベルの測定をした。また、イオンサプレッションにより定量法の再現性不良が引き起こされるため経時的なプロテオーム解析はN = 3で行い、試料前処理やLC/MSの分離度向上を図った。

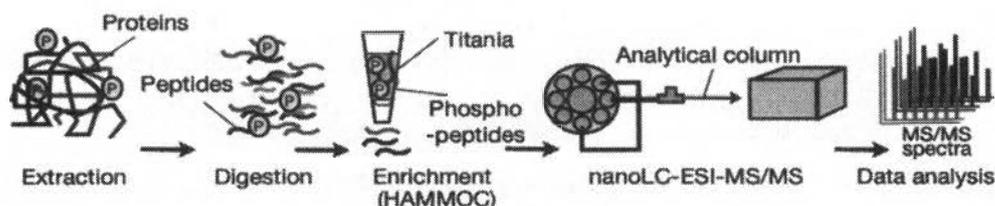


図1. 実験のワークフロー

タンパク質の抽出、消化・脱塩、HAMMOCを用いたリン酸化ペプチド濃縮、nano LC-MS/MS測定及びデータ解析のリン酸化プロテオーム解析における一連のワークフローを示した。

3.2.2. 測定法の確立

試料注入方法の検討、カラムの内径検討、メタルフリー測定、LC/MSのメソッドの最適化を行った (修士論文に詳細を記載)。

3.2.3. 測定法の確立

プロテオームの網羅性を向上させるにはタンパク質破碎・抽出が肝心であるため、ロスのない試料採取法・タンパク質可溶化液の検討 (SDS/SDCとUreaの比較)・破碎方法の検討を行った (修士論文に詳細を記載)。

2.4 経時的なリン酸化プロテオーム解析

2.2・2.3で得られた結果により、実験系を組んだ。*H. dujardini* に水分を抜き乾燥ストレスを与え、クマムシ5,000匹のActive状態 (0 h) とストレスを与えてから3時間後 (3 h)、Tun状態 (12 h) (以後、0 h, 3 h, 12 hと表記する) の3ポイントで試料を回収した。酵素消化後、HAMMOC法によりリン酸化ペプチドを濃縮し脱塩操作を行い、得られたリン酸化ペプチド画分をオートサンプラーを介し内径100 μ mの分析カラムで試料を導入しnano LC-MSで分析した。試料量と検体数、実験的に実行可能な時間を踏まえ3ポイントを測定した。Blastで*H. dujardini* に*R.varieornatus* の相同性検索を行いアノテーションをつけ、ペプチドレベルではSwissprotのGene Ontologyを用いてアノテーションした。

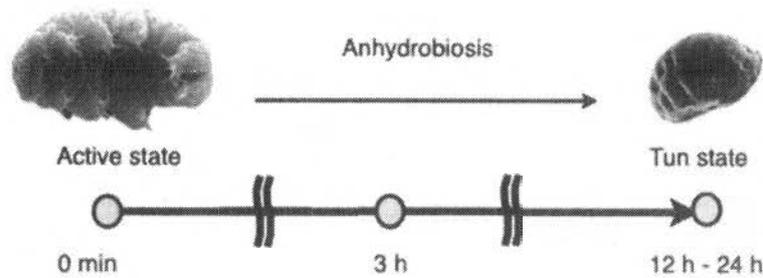


図2. 回収する時系列のポイント概略図

Active状態0時間, 乾燥ストレスを与えてから3時間, Tun状態の3ポイントを測定した。

H. dujardini 5000匹SDS/SLSを含むExtraction bufferで溶解した。すり潰されタンパク質は濁った上清となるたが破碎しきれていないクマムシは個体の形状のまま沈殿するため項のホモジナイザーでストローク回数50回すりつぶすごとに遠心(4°C, 3500 G, 10 min)し, 沈殿物をすりつぶす行程を顕微鏡で確認しながら, 完全にクマムシの個体が確認できなくなるまでこの操作を10回繰り返す, その後超音波破碎(20 min, interval 5 sec)をした。消化後, リン酸化ペプチド濃縮, 脱塩操作を行い, オートサンプラーを介し内径100 μ mの分析カラムで試料を導入しnanoLC-MS/MSで測定した。データベースとして, *H. dujardini* のトランスクリプトームアセンブリ配列を6フレームで翻訳しMASCOTで検索して用いた。

3. 結果と考察

3.1. 測定法の確立

試料導入では, 分析間でのばらつきを防ぎ再現性を優先させオートサンプラーを採用した。更に, カラムの内径を小さくすることでフリットを作製する必要があり熱の加え方によりフリットのばらつきが生じるため, フリットの必要ない内径100 μ mの分析カラムで試料を導入しnano LC-MSで分析した。

3.2. 前処理法の確立

従来プロテオミクスで使用されている8 M Urea と膜タンパク質可溶化剤のsodium deoxycholate (SDC) sodium lauroyl sarcosinate (SLS)を用いたPhase-transfer surfactants (PTS) 比較を行った。その結果, Ureaの2倍以上のペプチドを同定しそのうち約2/3以上のペプチドを網羅したSDC/SLSのタンパク質可溶化液を選択した(図3左)。破碎は, 超音波とホモジナイザーを組み合わせた方法を採用(図3右)し, ホモジナイズ回数は50回すりつぶすごとに遠心(4°C, 3500 G, 10 min)し, 沈殿物をすりつぶす行程を顕微鏡で確認しながら, 完全にクマムシの個体が確認できなくなるまでこの操作を10回繰り返す, その後超音波破碎(20 min, interval 5 sec)をした。

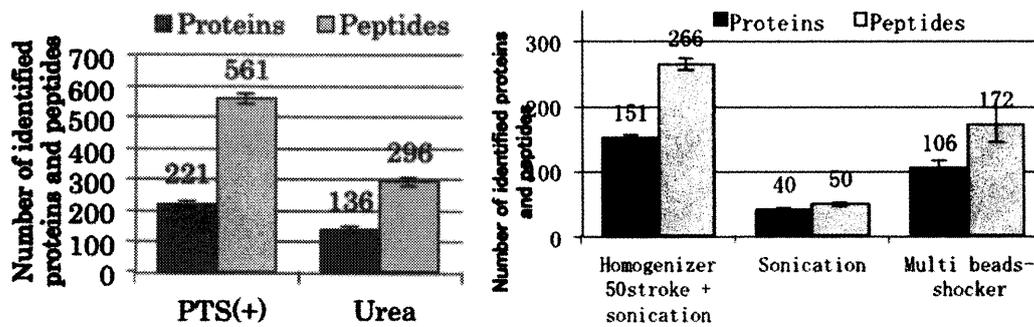


図3. (左) PTSとUreaでの同定したペプチド (右) 破碎法を比較したクマムシのホールプロテオームペプチド
Active状態の*H. dujardini* 200匹の試料を (左) ホモジナイザーでストローク回数100回し、超音波で破碎し、PTSで溶解した試料とUreaにより溶解 (右) ホモジナイザーで50ストロークし超音波破碎法、超音波破碎、凍結破碎法で破碎して得られたペプチドを示す (N=3)。オートサンプラーを介して内径100 μ mの分析カラムを導入し測定した。

3.3.3. Active状態とTun状態のホールプロテオーム・リン酸化プロテオームデータ解析

上記で選択した実験法を用いてクマムシ5,000匹のActive状態とストレスを与えてから3時間後、Tun状態 (以後、0 h, 3 h, 12 hと表記する) の3ポイントのホールプロテオームデータとリン酸化ペプチドを得た。その結果、ホールプロテオームでは1772個のペプチドのうち0 h: 751個, 3 h: 301個, 12 h: 153個を検出した。リン酸化ペプチドは330個検出しそのうち0 h: 104個, 3 h: 52個, 12 h: 51個得た (図4)。同定した1772個のホールプロテオームペプチドの中から0 h, 3 h, 12hの重複を示したのが図5左である。3ポイントの試料に共通して得られた115個のペプチドを時系列にあわせて4つのパターンにクラスター分けした (図5右)。時系列に伴い高くなっている変動・低くなっている変動、乾燥ストレスを与えてから3時間経過したタンパク質のみ低い・高い挙動パターンを示した。その中でも115個のうち81個のタンパク質が乾燥ストレスを与えてから3時間後のみ高くなるパターンを示した。

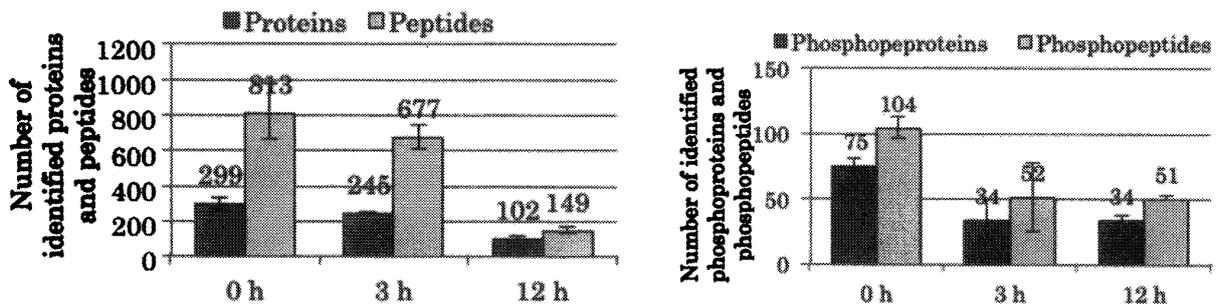


図4. *H. dujardini* の乾眠移行の経時的な (左) プロテオーム, (右) リン酸化プロテオームの定量結果

0 h: 乾燥ストレスを与える前のActive状態, 3 h: 乾燥ストレスを与えてから3時間後, 12 h: 乾燥ストレスを与えてから12時間後のTun状態を示す。それぞれ*H. dujardini* 5000匹の試料をホモジナイザーでストローク回数500回し、超音波で破碎し、PTSで溶解して得られたペプチドを示す (N=3)。オートサンプラーを介して内径100 μ mの分析カラムを導入し測定した。

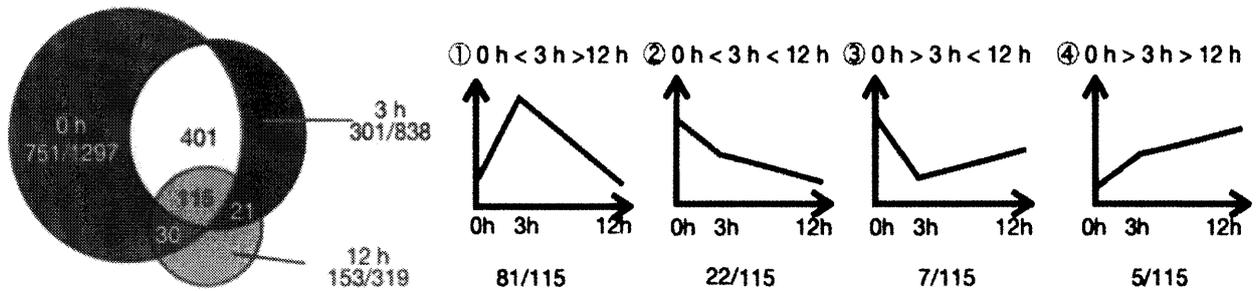


図 5. *H. dujardini* の経時的なホールプロテオーム定量結果の (左) 重複図, (右) 変動による 4 つのパターン分類
ベン図は 0 h, 3 h, 12 h の同定数を示し 3 ポイントに共通している 115 個のペプチドを定量結果により 4 つのパターンにクラスタリングした。

一方で、時系列と共に減少したのは 22 個、時系列と共に増加したのは 5 個、3 時間経過後に減少し増加するのを 7 個のタンパク質を検出した。言い換えれば、Active 状態から乾眠にかけてタンパク質レベルで増加していき変動するものの Tun 状態では減少する。Active 状態から 3 時間後増加するが Tun 状態で減少し、かつ Active 状態に比べて Tun 状態の方がより減少するペプチドは 81 個のうち 62 個を占めた。また、115 個中 92 個が Tun 状態に比べて Active 状態の方が増加していることが示唆された。これらの結果から、転写レベルでトランスクリプトームに変化がないがタンパク質レベルで変動があるという新たな知見が得られた。リン酸化プロテオームペプチドの定量結果 (図 6 左) から重複して得られた 19 個のペプチドを 4 つのパターンに分類した (図 6 右)。時系列と共にリン酸化が増加されているのは 19 個中 6 個存在した。一方、時系列と共にリン酸化が減少したのは 4 個同定し、3 時間経過の時に一番減少するのは 4 個同定した。ホールプロテオームでは最も多いパターンの乾燥ストレス 3 時間経過の時に増加するパターンは 5 個であり、そのうち Active 状態に比べて Tun 状態で減少したのは 2 個同定した。19 個中 12 個が Active 状態より Tun 状態で増加していた。特に、乾燥ストレスをかけ始めるときから 3 時間経過し、6 倍増加し、更に 9 時間経過し Tun 状態になったときに 2 倍増加し、乾眠前後で 14 倍も増加したリン酸化を発見した。リン酸化ペプチドはホールプロテオームペプチドと異なり特異的にかたよることなくまばらに分散された。

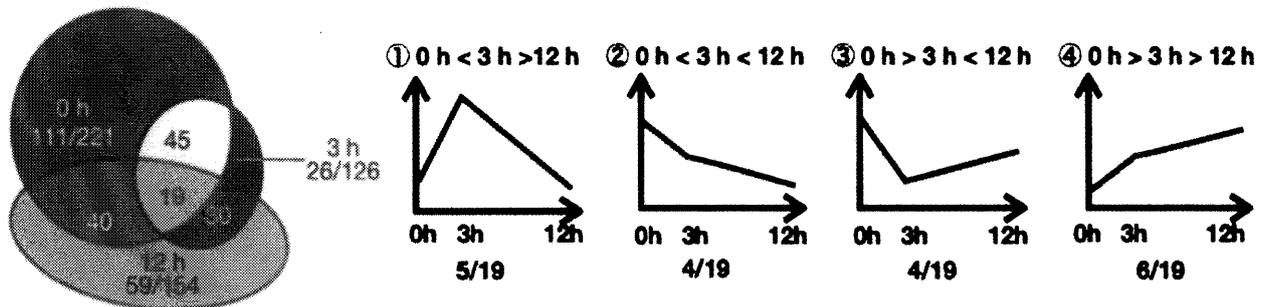


図 6. *H. dujardini* の経時的なリン酸化プロテオーム定量結果の (左) 重複図, (右) 変動による 4 つのパターン分類
ベン図は 0 h, 3 h, 12 h の同定数を示し 3 ポイントに共通している 19 個のペプチドを 4 つのパターンにクラスタリングした。

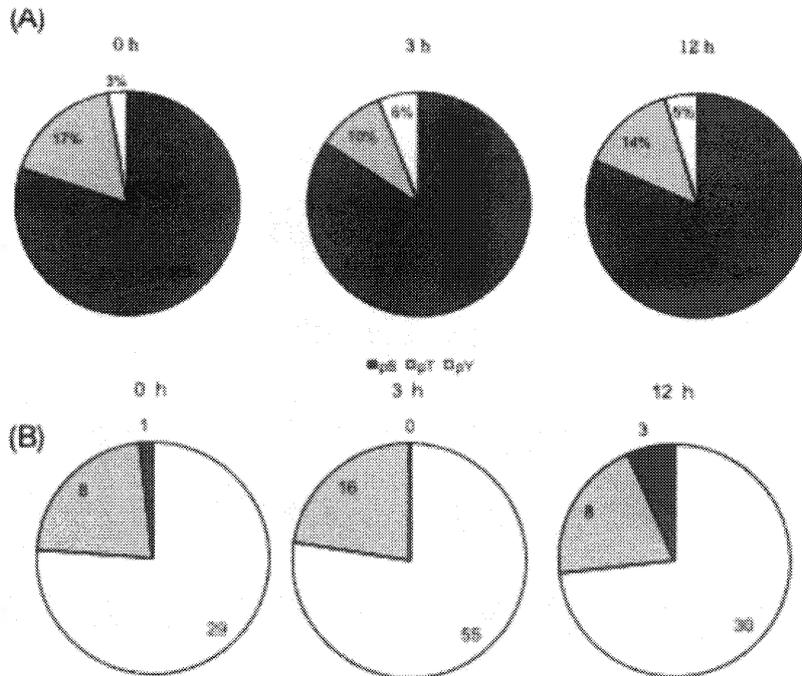


図 7. (A) 多リン酸化ペプチドの割合 (B) 経時的な変化によるリン酸化部位の割合

左側の円から乾燥ストレスを与える前のActive状態, 乾燥ストレスを与えてから3時間経過後, 乾燥ストレスを与えてから12時間経過後のTun状態を示す. それぞれ*H. dujardini* 5000匹の試料をホモジナイザーでストローク回数500回し, 超音波で破碎し, PTSで溶解してリン酸化ペプチド濃縮して得られたリン酸化ペプチドを示す (N = 3). オートサンプラーを介して内径100 μm の分析カラムを導入し測定した. (B): S: セリン・T: スレオニン・Y: チロニンシンの割合を示した.

また, 同定したリン酸化のうち約7割以上がモノリン酸化であり (図 7A), リン酸化サイトは経時的な変化によって差は見られなかった (図 7B).

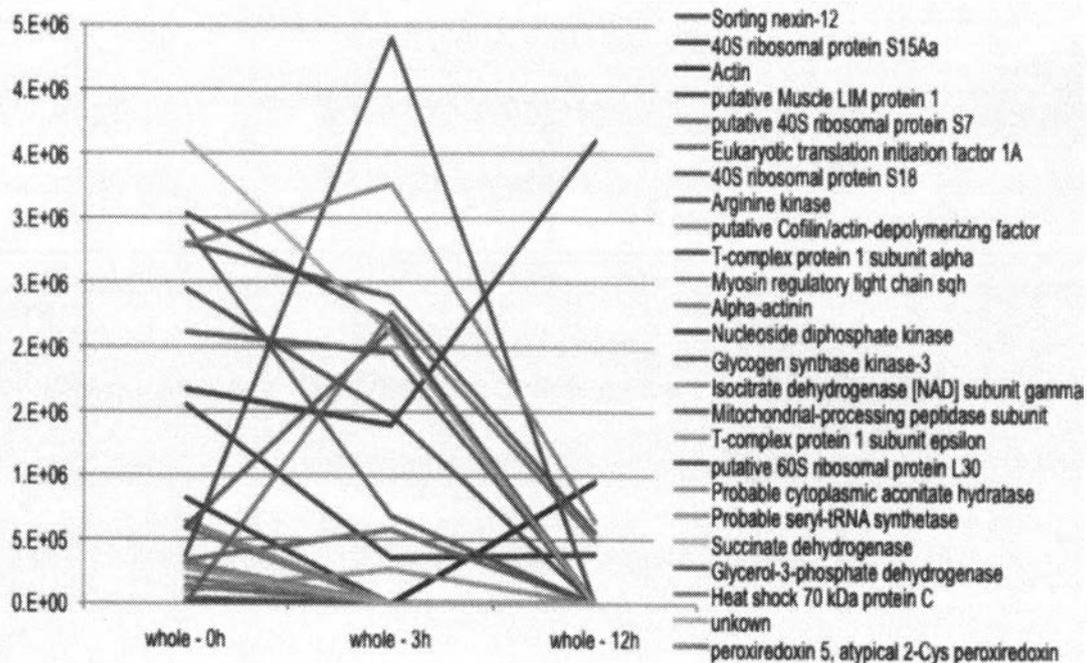


図 8. 経時的なプロテオームの定量解析

乾燥ストレスを与える前の0 h (Active状態), 乾燥ストレスを与えてから3時間経過後, 乾燥ストレスを与えてから12時間経過後のTun状態において回収したリン酸化ペプチドの定量結果を示した. 実線は, 0 h < 3 h < 12 h及び12 h < 3 h < 0 h (経時的に高くなっていく及び低くなっていく)を示し, 破線は, 3 h < 12 h, 3 h < 0 h (3 hのみ低い)を示し, 点線は, 0 h < 3 h, 12 h < 3 h (3 hのみ高い)を示した.

次にアノテーションをつけるためフィルタリングした。検出した1772個のホールプロテオームペプチドと330個のリン酸化ペプチドを統合しユニークなペプチドとして949個、タンパク質は363個得られた。Blastで*R.varieornatus* のデータベースと相同性解析しアノテーションついた118個のペプチドのうちユニークなタンパク質を25個同定し、図8でその25個のタンパク質の経時的な定量結果を示した。その中でもタンパク質のフォールディングに関与し、熱に対する耐性を形成させるHeat shock 70 kDa protein CはActive状態から3hで上昇し12hで減少する挙動を示した。これらより、*H. dujardini* の乾眠移行メカニズムにはリン酸化レベルではなくプロテオームレベルが関与していると想定された。

謝辞

本研究を行うにあたり終始暖かくも厳しいご指導ご鞭撻を頂いた京都大学大学院 薬学研究科准教授 杉山直幸氏、慶應義塾大学 政策・メディア研究科特任講師 荒川和晴氏、慶應義塾大学 政策・メディア研究科特任助教 森大氏に心より感謝申し上げます。

杉山氏には基礎からプロテオーム解析を丁寧にご指導して頂きました。また、本論文をご精読頂き有用なコメントを頂き深謝致します。本論文審査において貴重なご指導と飼育のためのクマムシ及びデータベースを提供して下さった荒川氏に心より感謝申し上げます。森氏には、修士2年目からアドバイザーとして熱心にご指導とご教示して頂きこの場を借りて感謝の意を述べさせて頂きます。また、増田豪氏には、高感度分析システムを一からご教示くださり、分析カラムへの試料導入や測定は全て手動で行わなければならず大変お世話になりました。「高感度Week」と名がつくほど高感度分析は時間と労力がかかる中で、数週間寝ずにラボに泊まりこみで24時間ご指導して下さり大変感謝しております。大沼澄子氏には、実験技術を丁寧にご指導して頂き暖かい激励をくださり実験のことで相談した時には優しくご教示して下さり感謝しております。斉藤緑氏には、優しく質問に答えて下さり丁寧に教えて下さりいつも笑顔で研究を応援して下さりととても感謝しております。緑氏とはプロテオームグループに所属する前から知り合い公私共にお世話になりました。<旧プロテオームグループ>いつも素敵なお顔で癒して下さった五十嵐康行氏、高校生の頃からお世話になり修士1年の時に一番時間を過ごしたと言っても過言ではないほど、どのコミュニティも被っており兄のような玉木聡志氏、私にとって憧れであり頼れるお姉さん的な存在で先輩として学生生活や研究に必要な事をご教示して下さった岩崎未央氏、今村春奈氏には感謝しております。<新プロテオームグループ>可愛い後輩である郭セイ氏と山久保純氏は、いつも体調や睡眠・食事などを気遣って下さったことにとっても感謝しております。郭氏と山久保氏は私にとって可愛い双子の妹のような存在で2人がプロテオームグループに来たことをとても嬉しく思います。郭氏には美味しい手料理や笑いや優しさを提供して頂き研究のディスカッション及びプロテオーム部屋の隣として支えあってきました。山久保氏は、ウラシルやFCファラオでも一緒に基本的にコミュニティが重なっており、「俺の背中中は任せた」と言われてから1年で急激に仲良くなりいつも笑顔で優しく助けて下さいました。また、金井昭夫氏の授業は本当に学ばせて頂き今までのどの授業よりも一番成長し楽しく過ごすことが出来ました。公私共に親身に相談のついでに下さりいつも激励をくださり心から感謝申し上げます。板谷光泰氏にはTAや授業でお世話になりよくでる板谷さんシャレが好きでした。

修士1年春から2年間は鶴岡キャンパスで学び公私ともに充実した1年間を過ごす事が出来たのもファミリーのような鶴岡在住の先輩・同期・後輩方、社会人やFCファラオの方々のお陰です。特に、尊敬する廣瀬友香氏、上瀧明氏、伊原頌二氏なくしては鶴岡生活を過ごせなかったと言っても過言ではないほどお世話になりました。楽しい事を分かち合い、辛い時には支えて頂き、精神的に支えて頂きました。心から感謝しております。修士になり廣瀬氏には今まで以上に濃い関係を築き、辛いことや悩んだ時はお互い励まし合い乗り越えられたのも廣瀬氏のお陰です。本音で語り合い、価値観や感覚が違っていても認められる関係だと思っています。上瀧氏は後輩とは思えない位いつもお世話になっており、買い物散歩や卓球部、早朝テニス等企画した時やスポーツDAYという無茶ぶりにも付き合っ下さり本当にありがとうございます。上瀧氏の笑いのツボがおかしいと思いますが私は大好きです。誰よりも相手を思いやり上瀧ワールドに取り込む力を尊敬しております。伊原氏は08同期代であり、面倒見のいいお兄さんであったり、末っ子力を発揮していたり、公私ともに頼ってばかりで多くの事を相談させて頂きましたがいつも率直に話して下さるので私にとって癒やしの存在でした。美味しいものを沢山食べたり卓球、ジョギング、スノボ、スラックライン等あらゆるスポーツを堪能させて頂きました。深謝しております。

また、充実した鶴岡生活を語るには林謙太郎氏、村田真也氏、田中美穂氏、和田圭介氏、山本優理氏、中村浩之氏、松浦亜里沙氏なくしては語りきれないほど公私ともにお世話になりました。鶴岡が庭の林氏には、色々なところに連れて行って下さり視野が広がりました。我らの「真也様」である真也様にはいつも見守って頂き今まで以上にMURATISMを築けたと思います。田中氏には何事においてもいつも親身に相談のついでに下さりありがとうございます。和田氏には色々とお助け頂きました。山本氏とはしょっちゅうご飯や買い物に行き語り合いラボでずっと泊まりこんで研究活動を励まし合いながら行いましたね。中村氏には高校生の頃から優しくして頂き本当にお世話になりました。松浦氏とは1年という短い期間でしたが密度の高い関係で高専メンバーや秋場氏にもお世話になり松浦氏とは出会えて良かったです。<FCファラオ>いつも笑顔で低ボイスの夕日ハウス池田氏、良いシュートを決めた時に絶対褒めて下さる村上氏、可愛らしくフットサルが上手な山中氏、きっちり男の約束を果たしかっこいい上田氏、美味しいご飯をつくって下さり山伏や何にでもなれてしまう今野優氏、及び日本酒カクテル製作時に大変お世話になった美女の佐野陽子氏、<スパイバー>明るくいつも可愛い上原知子氏、スラックラインやスポーツが上手な広田ちえ氏、<HMT>常に幹事の大賀氏、洪い声で面白い佐藤基氏、<ラボ棟>ゲノムデザイングループにも関わらずいつも美味しい食べ物の

情報や差し入れをくださり優しい富樫氏及び富樫夫妻, 美味しい赤ワインを教えてくださいの中東氏, <事務>アカペラで部活の如く練習を行いしっかりした優しいお姉さんのような大池真紀氏, 何事にも積極的でパワフルなお姉さま斉藤彩氏, 癒やしの笑顔を放つ菅原和音氏, イベント毎で全力投球し元気な塩澤明子氏のお陰で彩りのある鶴岡生活を送ることが出来ました. <鶴岡在住生>生年月日と誕生時間まで一緒の正反対の福澤玲奈氏とはラボ棟2階唯一の学生として様々な事を語り合い色々な一面をしれてとても楽しかったです. <ウラシル棟>窓辺の美女でありカタラーゼをしあった白居優希氏, どんな運動にも一緒についてきてくれる可愛い梅田栄美氏, 同期であり修士のことでひょこっとプロテオーム部屋によく来ており, ご飯にさそってくれる可愛い井内仁志氏, <BC生>ばばちゃんワールド満載でとても優しい心の持ち主の馬場千聖氏, 色々と語り合った可愛い伊藤優太郎氏, 卓球部としていつもやる気に満ち溢れどんな時にもかけつけてくれる森ひでと氏, がいたお陰で笑いが絶えずカタラーゼすると止まらず学生らしく過ごすことが出来ました. 多くの人に色々なイベントに協力して頂きました. この場を借りて感謝申し上げます. 愛情を込めて育ててはすりつぶすといった事を繰り返しましたが, 愛らしいくりくりおめめのクマムシ(｡････)には大変お世話になりました. 本当にありがとうございます. クマムシ研究者及びクマムシのいちファンとして感謝申し上げます. また, いつも研究活動を応援して下さり美味しい食べ物や激励をくださった中館ファミリー, 佐藤ファミリー, 長谷部ファミリーには大変感謝しております.

最後になりましたが, 研究活動に励む事が出来たのも大きな愛情で24年間支えてくださった長谷部久美子氏のお陰です. 心から感謝の意を表したいと思います. また, このような素晴らしい研究環境を与えてくださった慶應義塾大学 環境情報学部 富田勝教授に, 厚く御礼申し上げます.

参考文献

- Altiero, T., Guidetti, R., Caselli, V., Cesari, M. & Rebecchi, L. Ultraviolet radiation tolerance in hydrated and desiccated eutardigrades. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **49**, 104–110 (2011).
- Bavan, S., Straub, V. A., Blaxter, M. L. & Ennion, S. J. A P2X receptor from the tardigrade species *Hypsibius dujardini* with fast kinetics and sensitivity to zinc and copper. *BMC Evol. Biol.* **9**, 17 (2009).
- Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A. J. R. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* **4**, 484–494 (2009).
- Collins, M. O., Yu, L. & Choudhary, J. S. Analysis of protein phosphorylation on a proteome-scale. *Proteomics* **7**, 2751–2768 (2007).
- Crowe, J. H. Trehalose as a “chemical chaperone”: fact and fantasy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **594**, 143–158 (2007).
- Crowe, L. M. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **131**, 505–513 (2002).
- Davis, M. T. & Lee, T. D. Rapid protein identification using a microscale electrospray LC/MS system on an ion trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 194–201 (1998).
- Dayon, L. et al. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* **80**, 2921–2931 (2008).
- Dephoure, N. et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10762–10767 (2008).
- Dieter, A. bei dem Tardigraden *Hypsibius dujardini*. *Chromosoma* **23**, 203–213 (1967).
- Emmett, M. R. & Caprioli, R. M. Micro-electrospray mass spectrometry: Ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 605–613 (1994).
- Gabriel, W. N. et al. The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development. *Dev. Biol.* **312**, 545–559 (2007).
- Gatlin, C. L., Kleemann, G. R., Hays, L. G., Link, A. J. & Yates, J. R. Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **263**, 93–101 (1998).
- Greven, H. Comments on the eyes of tardigrades. *Arthropod Struct. Dev.* **36**, 401–407 (2007).
- Guidetti, R., Altiero, T. & Rebecchi, L. On dormancy strategies in tardigrades. *J. Insect Physiol.* **57**, 567–576 (2011).
- Guidetti, R. & Bertolani, R. Tardigrade taxonomy: an updated check list of the taxa and a list of characters for their identification. *Zootaxa* **845**, 1–46 (2005).
- Guil, N. & Cabrero-Sañudo, F. J. Analysis of the species description process for a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada). *Biodivers. Conserv.* **16**, 1063–1086 (2007).
- Hengherr, S., Worland, M. R., Reuner, A., Brümmer, F. & Schill, R. O. Freeze tolerance, supercooling points and ice formation: comparative studies on the subzero temperature survival of limno-terrestrial tardigrades. *J. Exp. Biol.* **212**, 802–807 (2009).
- Hengherr, S., Heyer, A. G., Köhler, H.-R. & Schill, R. O. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades—evidence for divergence in responses to dehydration. *FEBS J.* **275**, 281–288 (2008).
- Hopfgartner, G., Bean, K., Henion, J. & Henry, R. Ion spray mass spectrometric detection for liquid chromatography: A concentration- or a mass-flow-sensitive device? *J. Chromatogr. A* **647**, 51–61 (1993).
- Horikawa, D. D. et al. Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation. *PLoS One* **8**, e64793 (2013).
- Horikawa, D. D. & Higashi, S. Desiccation tolerance of the tardigrade *Milnesium tardigradum* collected in Sapporo, Japan, and Bogor, Indonesia. *Zool. Sci.* **21**, 813–816 (2004).
- Horikawa, D. D. et al. Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: a new model animal for astrobiology. *Astrobiology* **8**, 549–556 (2008).

- Horikawa, D. D. et al. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 843–848 (2006).
- Horikawa, D. D. et al. Tolerance of anhydrobiotic eggs of the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* to extreme environments. *Astrobiology* **12**, 283–9 (2012).
- Huttlin, E. L. et al. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* **143**, 1174–1189 (2010).
- Ishihama, Y., Rappsilber, J., Andersen, J. S. & Mann, M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J. Chromatogr. A* **979**, 233–239 (2002).
- Jönsson, K. I. Tardigrades as a potential model organism in space research. *Astrobiology* **7**, 757–766 (2007).
- Jönsson, K. I., Rabbow, E., Schill, R. O., Harms-Ringdahl, M. & Rettberg, P. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Curr. Biol.* **18**, R729–R731 (2008).
- Jönsson, K. & Persson, O. Trehalose in three species of desiccation tolerant tardigrades. *Open Zool. J.* 1–5 (2010).
- Kikawada, T. et al. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 56–61 (2006).
- Kosako, H. et al. Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1026–1035 (2009).
- Mann, M. & Kelleher, N. L. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18132–18138 (2008).
- Masuda, T., Saito, N., Tomita, M. & Ishihama, Y. Unbiased quantitation of *Escherichia coli* membrane proteome using phase transfer surfactants. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 2770–2777 (2009).
- Masuda, T., Sugiyama, N., Tomita, M. & Ishihama, Y. Microscale phosphoproteome analysis of 10,000 cells from human cancer cell lines. *Anal. Chem.* **83**, 7698–703 (2011).
- Masuda, T., Tomita, M. & Ishihama, Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J. Proteome Res.* **7**, 731–740 (2008).
- Nakagami, H. et al. Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.* **153**, 1161–1174 (2010).
- Neumann, S., Reuner, A., Brümmer, F. & Schill, R. O. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **153**, 425–429 (2009).
- Oliver, A. E. et al. Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology* **43**, 151–167 (2001).
- Olsen, J. V et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal.* **3**, ra3 (2010).
- Ong, S.-E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386 (2002).
- Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **75**, 663–670 (2003).
- Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* **2**, 1896–1906 (2007).
- Rigbolt, K. T. G. et al. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci. Signal.* **4**, rs3 (2011).
- Right, J. C. W. Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek : What Have We Learned about Tardigrades? *Zool. Anzeiger - A J. Comp. Zool.* **240**, 563–582 (2001).
- Ross, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 1154–1169 (2004).
- Schokraie, E. et al. Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. *PLoS One* **5**, e9502 (2010).
- Stoddard, R. Preserving tardigrades under pressure. **395**, 3–4 (1998).
- Sugiyama, N. et al. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1103–1109 (2007).
- Thompson, A. et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 1895–1904 (2003).
- Watanabe, M. et al. Physiological traits of invertebrates entering cryptobiosis in a post-embryonic stage. *Eur. J. Entomol.* **101**, 439–444 (2004).
- Watanabe, M. et al. Physiological changes leading to anhydrobiosis improve radiation tolerance in *Polypedilum vanderplanki* larvae. *J. Insect Physiol.* **53**, 573–579 (2007).
- Watanabe, M. et al. Biological effects of anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* on radiation tolerance. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 587–592 (2006).
- Westh, P. & Ramlov, H. Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.* **258**, 303–311 (1991).
- Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E. & Warscheid, B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**, 340–350 (2007).
- Wilm, M. & Mann, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**, 1–8 (1996).

- Yamaguchi, A. et al. Two Novel Heat-Soluble Protein Families Abundantly Expressed in an Anhydrobiotic Tardigrade. *PLoS One* **7**, e44209 (2012).
- Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **434**, 4451–4459 (1984).
- Zieske, L. R. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J. Exp. Bot.* **57**, 1501–1508 (2006).