

タンパク質GAPDHから探るクマムシのストレス耐性

はじめに

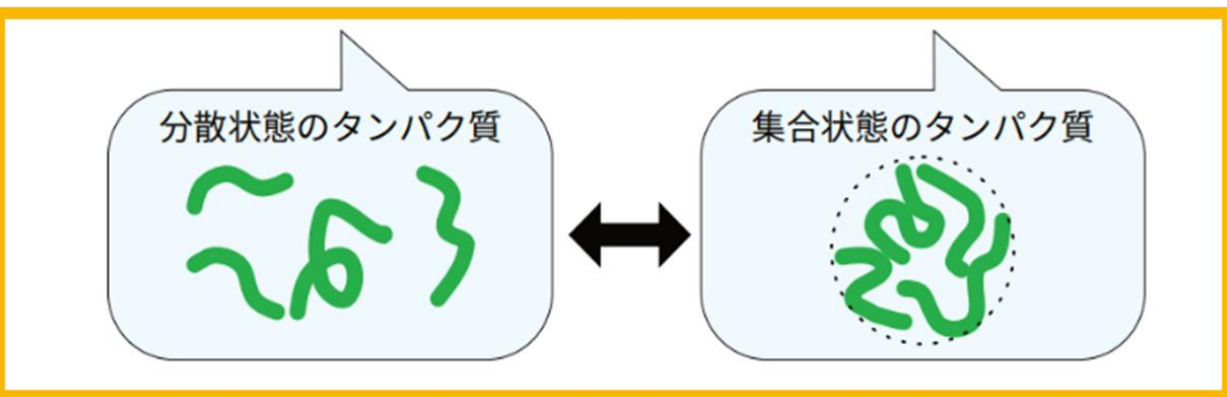
クマムシとは

緩歩動物門に属する体長1mm程度の生物。体内の水分を失うと『乾眠』とよばれる無代謝状態に移行する。この状態のクマムシは、 $-273^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、真空75000気圧、数千グレイの放射線、宇宙空間などへの耐性を示す。



図1ヨコヅナクマムシ <https://th.bing.com/th/id/OIP.tYc1-8JsSIRHwAUwqrnTHQHAE8?pid=ImgDet&rs=1>
Accessed 25 Aug. 2023

CAHS タンパク質



私たちはクマムシ固有のものではなく、他の生物にも発現するタンパク質においてもストレス耐性があるのではないかと考えた。

図2 ストレス下で変化するクマムシ固有のタンパク質の構造*1

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)

- ・真核生物に普遍的に発現する
- ・解糖系の反応を触媒する酵素の一つ
- ・酸化ストレス下における細胞死への誘導、損傷からの回復*2

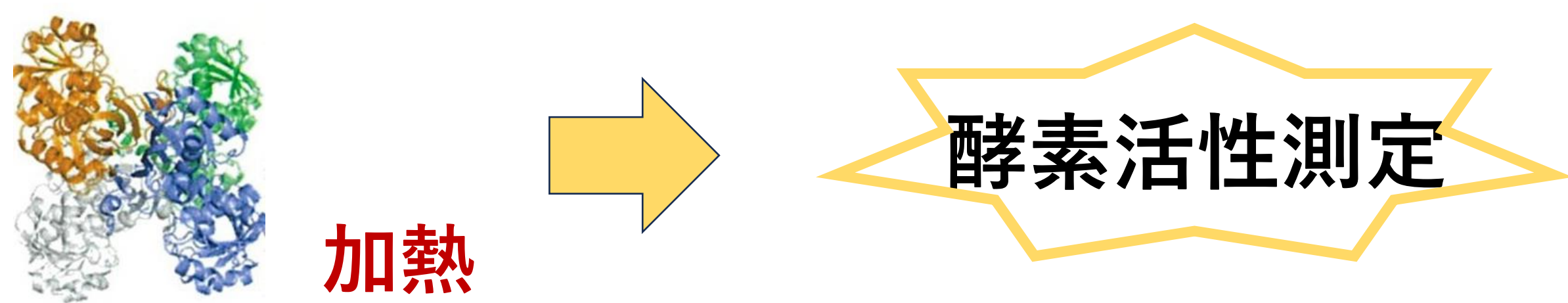
背景

昨年度の研究で、GAPDHタンパク質を発現する大腸菌の作成に成功しタンパク質を精製したのち、酵素活性を測定した。

目的/仮説

以下の2つの実験を検証する。

- ・クマムシのGAPDHタンパク質は、熱を加えた状態でも酵素活性を維持することができる。
- ・耐性を持たない生物よりも活性が大きい。



比較対象生物:キイロショウジョウバエ

クマムシのGAPDHタンパク質とアミノ酸配列が類似しているが、熱耐性を持たないと予想できる。アミノ酸配列の違いに熱耐性が関与しているのではないかと考えられる。



図3 キイロショウジョウバエ
<https://www.pref.saitama.lg.jp/b0714/eiseigaityu/hae.html>

実験方法

熱を加えた酵素活性測定

1. 精製したGAPDH 25 μl 、100mMのNAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) 16 μl 、 K_2HPO_4 8 μl 、Tris Buffer (溶液量1mL) をヒートブロックを用いて 60°C 10分で加熱してセルに入れる。
2. 100mMのG3P(基質、glyceraldehyde-3-phosphate)をセルに入れ、340nmの波長の光を当てた際の吸光度の変化を10分程度3回記録する。
3. 60°C での活性を測定した後、30、40、 50°C でも同様に測定する。

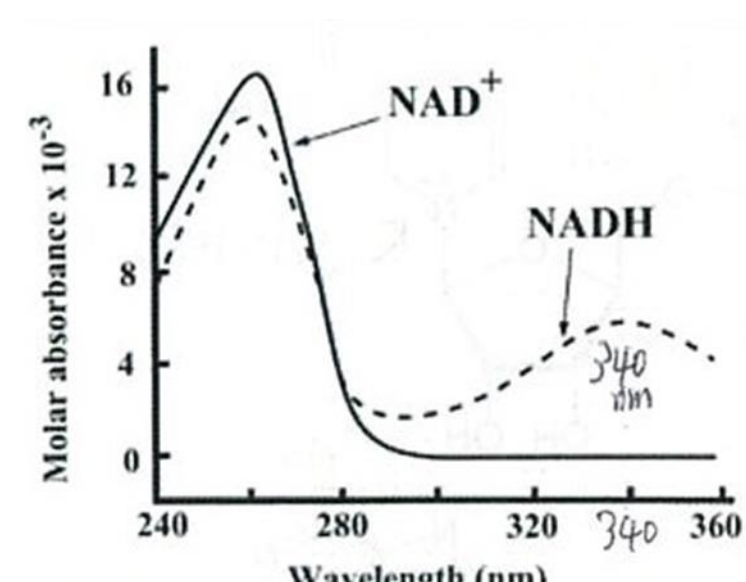
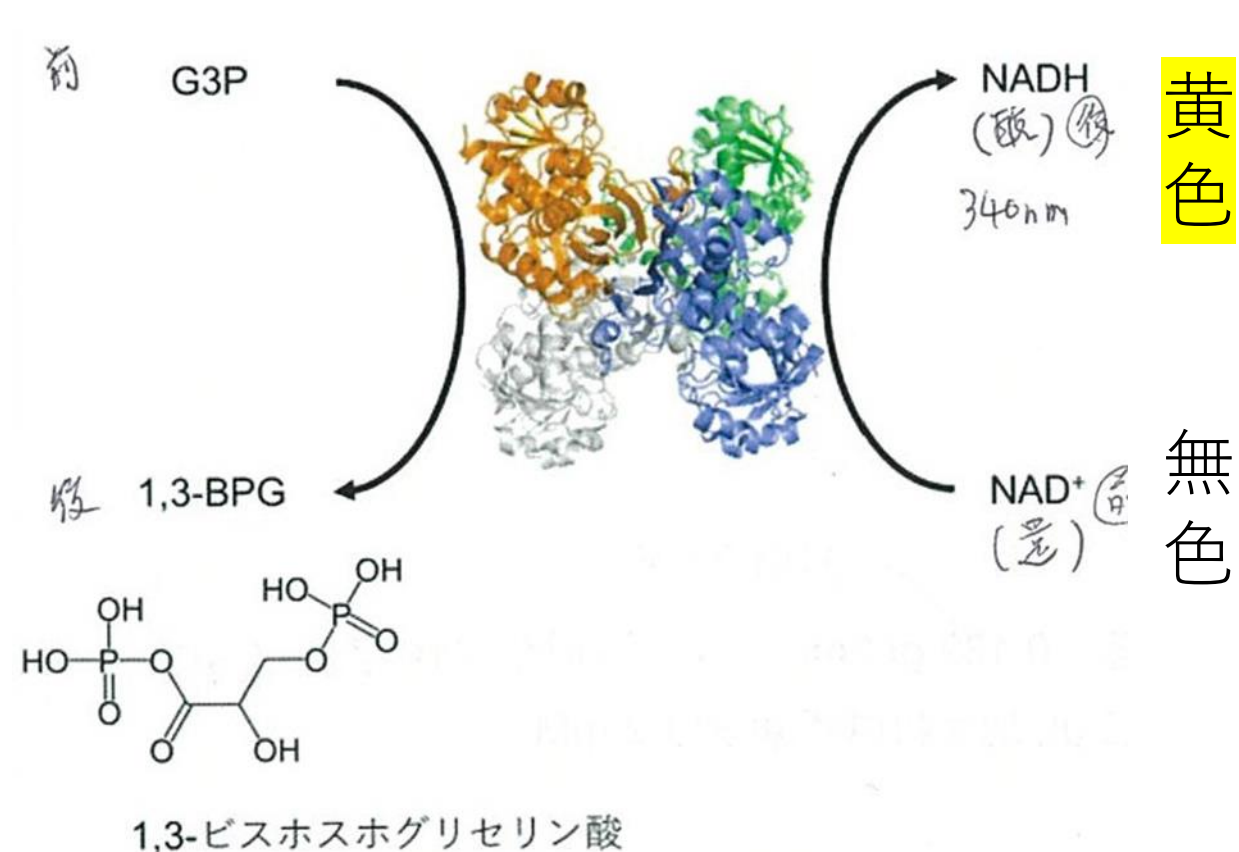


図4 酵素活性測定の実理

結果

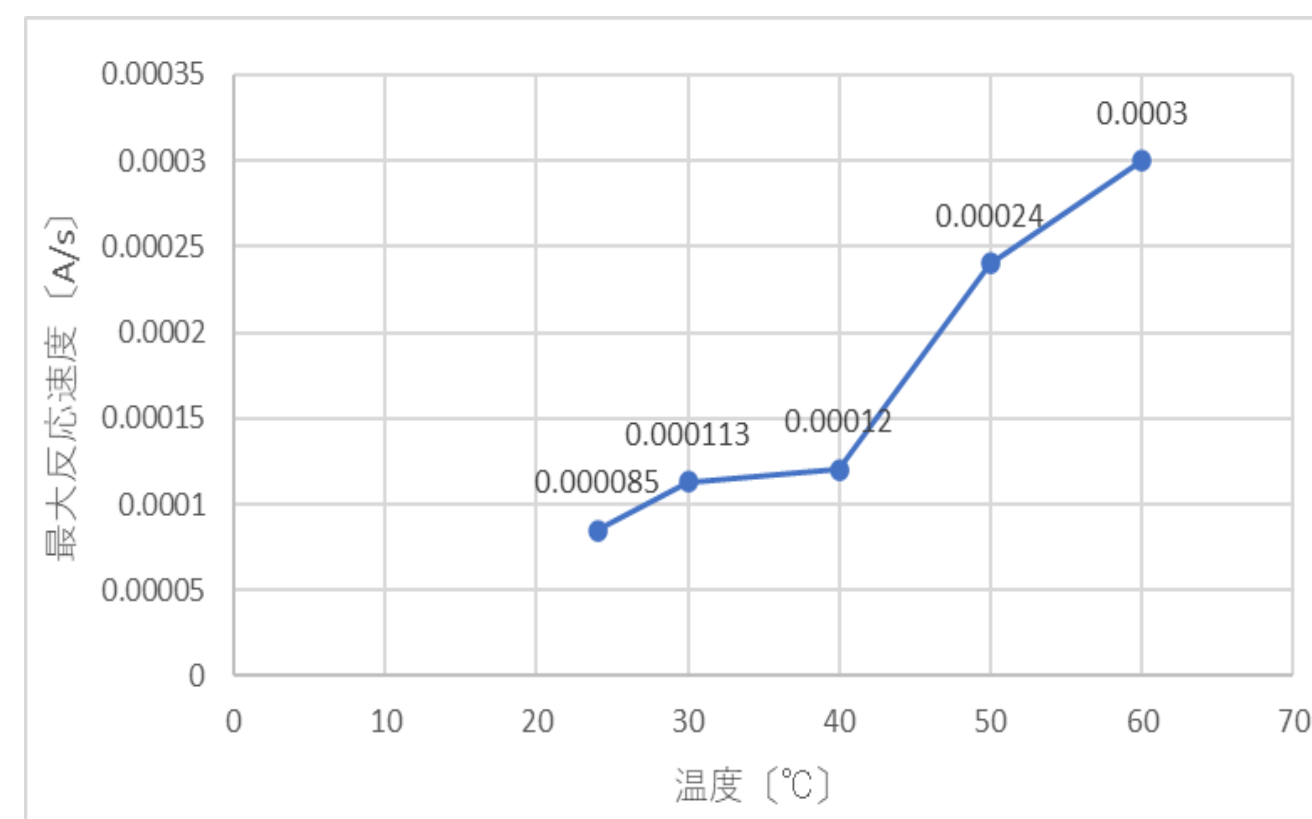


図5 加熱温度と最大反応速度の関係

全ての温度において酵素の活性が確認できた。吸光度直線の傾きから温度ごとの最大反応速度を求めた。

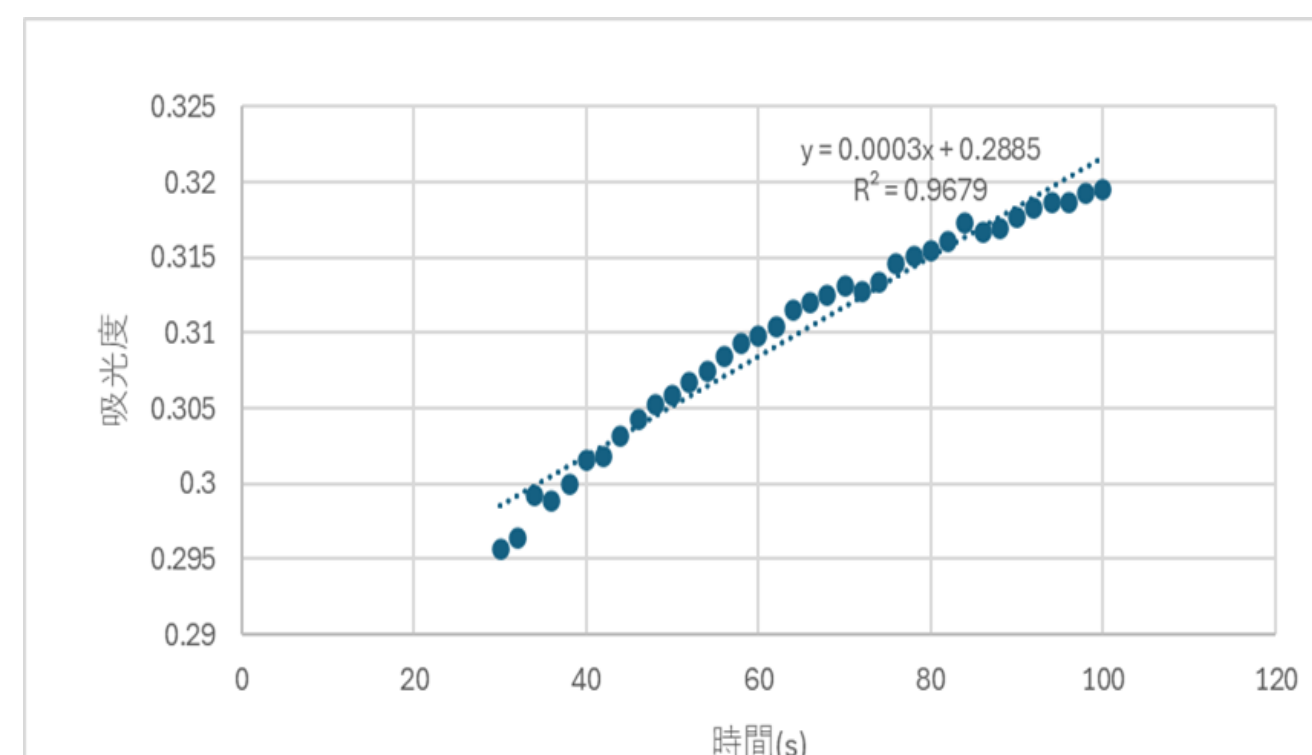


図6 60°C における最大反応速度の傾き

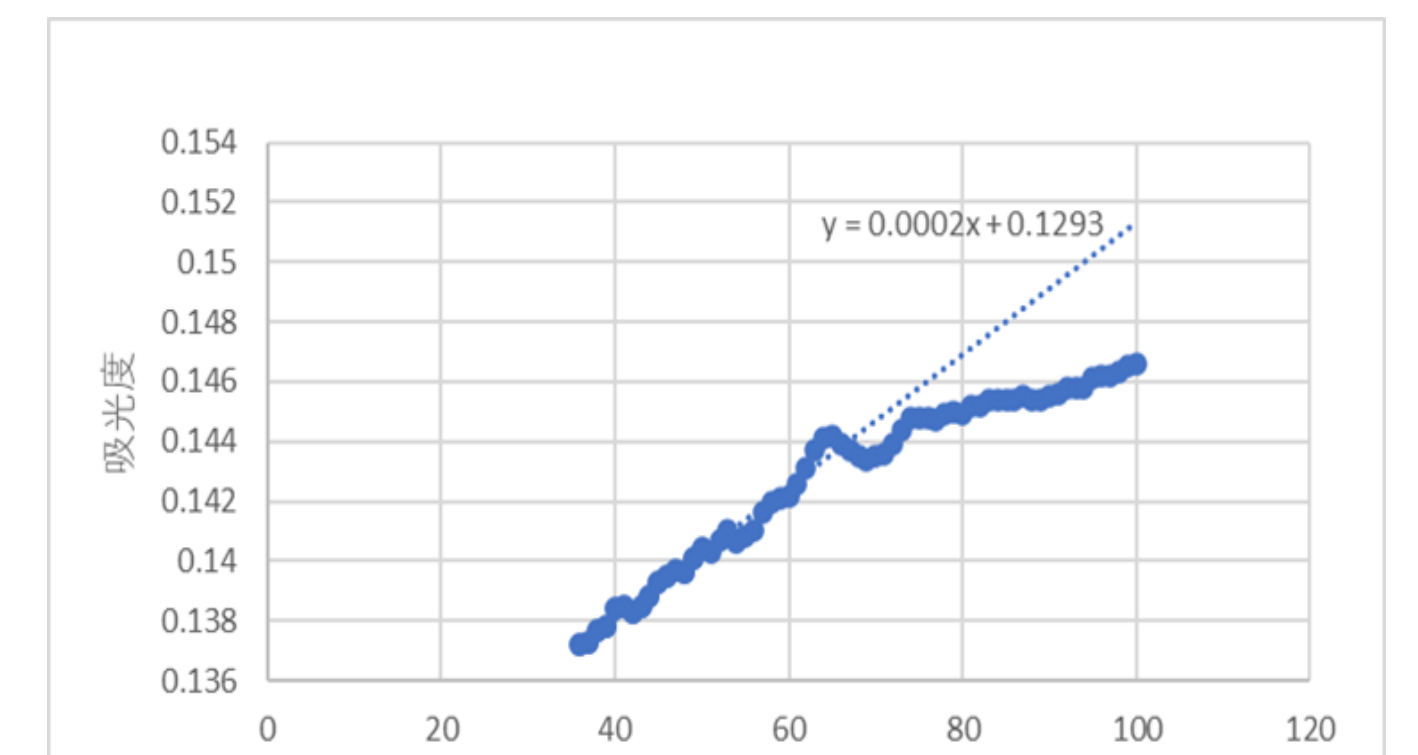


図7 80°C における最大反応速度の傾き

考察

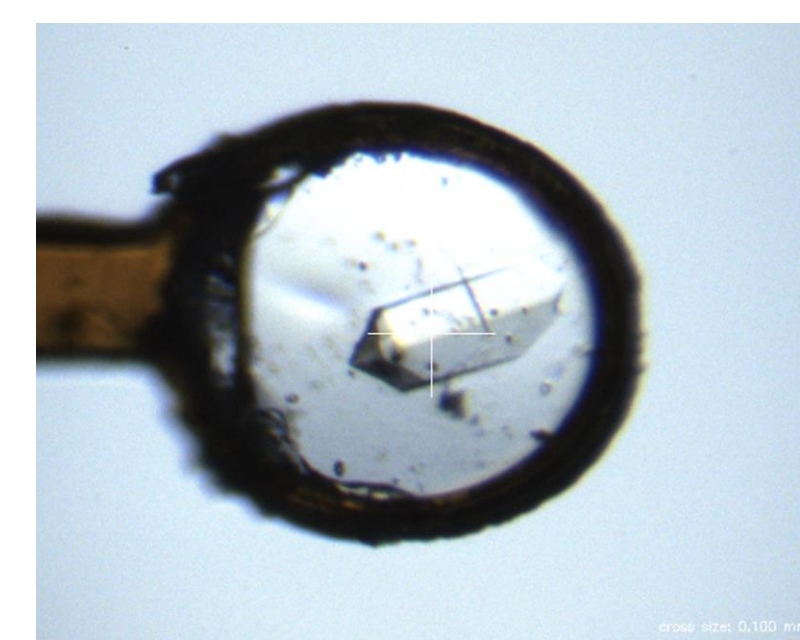
温度が高くなるにつれ最大反応速度も大きくなっている。

80°C で加熱

変成し沈殿したタンパク質が室温で溶解
活性測定を行うと、溶解したタンパク質が反応
⇒クマムシのGAPDHタンパク質は熱によって変性しても温度が戻ることで復活する可能性があると考えられる。

今後の展望

- ・クマムシのGAPDHタンパク質変性後の変化について、実験条件を検討して研究を行う。
- ・キイロショウジョウバエにおいて、今後飼育環境や餌の作製について見直し改善していく。
- ・キイロショウジョウバエのタンパク質精製を目指す。
- ・X線構造解析によって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する。



結晶化条件
0.1 M Magnesium chloride hexahydrate
0.1 M Tris 8.5
33 % v/v PEG 400
0.1 M Sodium chloride

図8 析出したGAPDHタンパク質の結晶

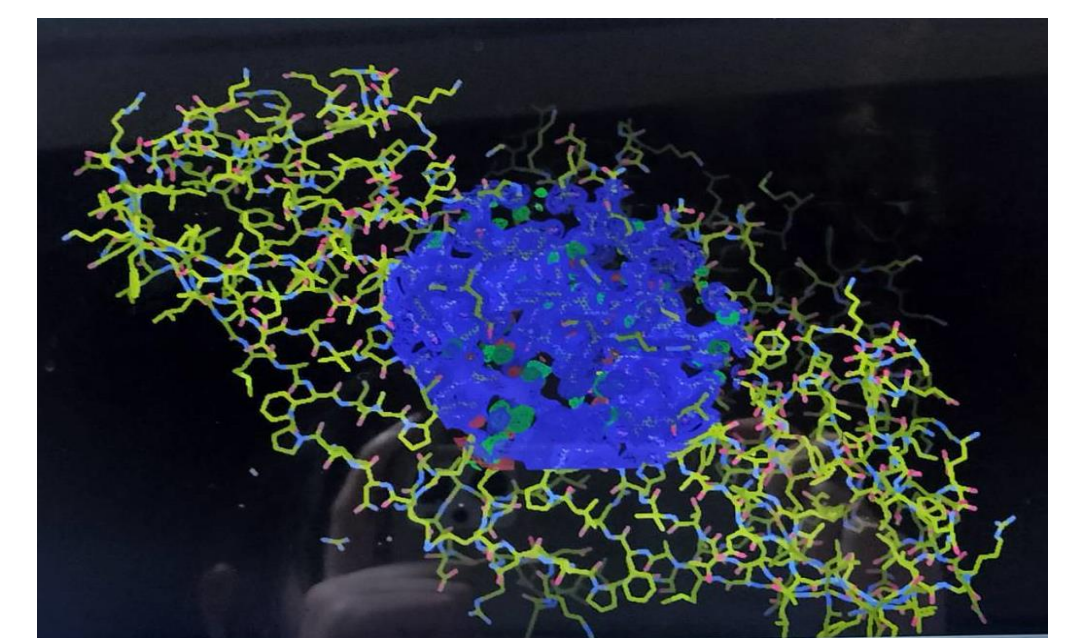


図9 コンピューターでの解析画面

参考文献

- *1.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)
- *2 Carlos Tristan,, Neelam Shahani ,, Thomas W. Sedlak ,, Akira Sawa.(2011) The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments.ScienceDirect Volume 23 Issue 2

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いまし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。