

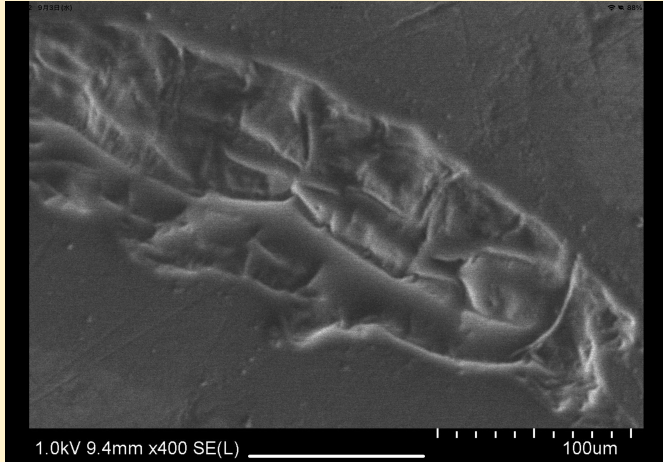
タンパク質の立体構造から クマムシの特殊性を解明する

神奈川県立厚木高等学校

2D β 4班

背景

活動状態



脱水

給水

乾眠状態

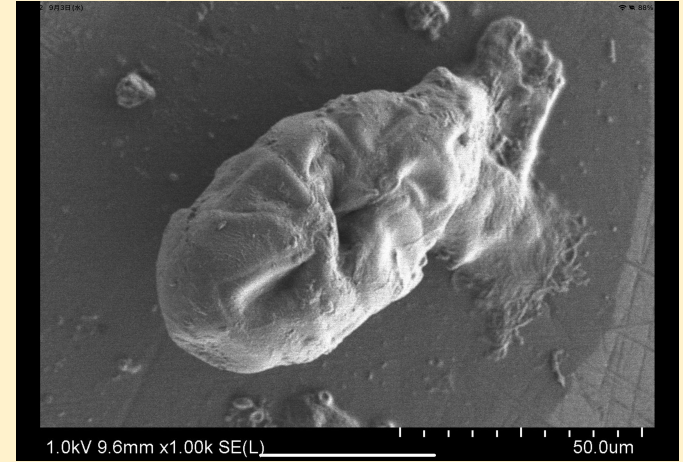


図1 活動状態と乾眠状態におけるクマムシの様子

乾眠状態 = 極限環境耐性を有する

背景



図2 クマムシの研究派生図

応用分野は広いが **分子レベルは未解明**
→クマムシの特性を基盤とした **応用研究への貢献**

目的

クマムシ由来タンパク質の **立体構造のモデル化**



他生物の相同タンパク質との **構造比較**



保存された構造 とクマムシ特有の構造差の抽出



クマムシの分子的特殊性の解明

先行研究と概要

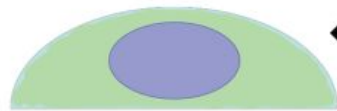
- ・(特定の種において)高温における抗凝集性と乾燥耐性に相関関係
- ・抗凝集性タンパク質は活動状態において常に大量に発現する



クマムシ固有のタンパク質

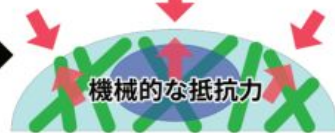
- ・336種ある中にCAHSタンパク質が含まれていた²

本研究から予想されるCAHSタンパク質が細胞を保護する仕組み
非ストレス条件



CAHS発現細胞

高浸透圧ストレス



CAHS発現細胞

- ↑細胞の硬さ
- ↑細胞体積の維持
- ↑ストレス条件下の生存率

非ストレス条件 (ストレス前) → 高浸透圧ストレス条件 → 非ストレス条件 (ストレス後)

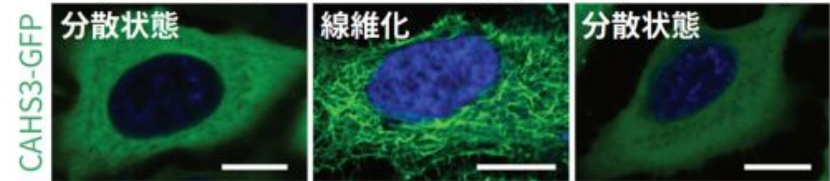


図3 ストレス条件下とそうでない場合のCAHSタンパク質の状態とその仕組み

先行研究と概要

Alphafold2: DeepMind社が開発したアミノ酸配列からタンパク質の立体構造を高い精度で予測する AIプログラム

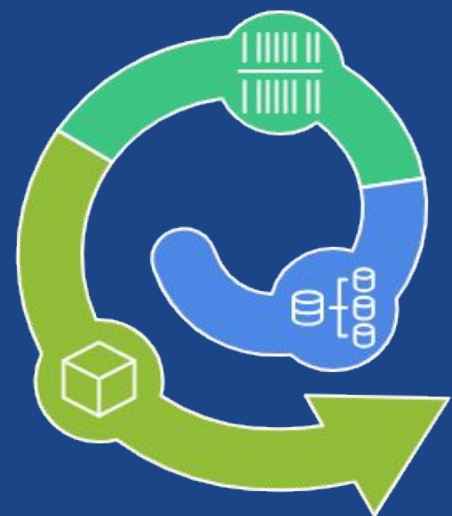


図4 Alphafold2の仕組み

- 01 既存のタンパク質データベースを学習
- 02 アミノ酸配列間の相関関係を分析
- 03 立体構造を推定

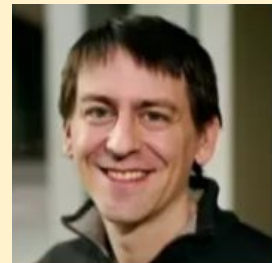
2024年ノーベル化学賞を受賞



David Baker



Demis Hassabis



John M. Jumper

タンパク質の立体構造予測を AIで解決し、ほぼ全ての既知タンパク質の構造を予測可能にした

仮説

クマムシは節足動物や線虫と同じ脱皮動物と比較した際に、共通の立体構造を基盤としつつ、機能的に特化したタンパク質を有している

DDBJ: DNA Data Bank of Japanの略。

国立遺伝学研究所が運営する日本で唯一の国際的な
塩基配列データベース のこと

BLAST: 遺伝子やタンパク質の配列の類似性 を高速に検索
する、生物情報科学で必須のプログラムのこと

ProtelInfer: アミノ酸配列から タンパク質の機能を直接予測

TM-score: 2つのタンパク質の 構造の類似性を定量化
するための指標

TM-align: 2つのタンパク質の立体構造を比較し、最適な構造
アライメントを特定 するためのソフトウェア

実験方法

1.DDBJ上で*Tardigrade*由来の塩基配列を取得する

2.クマムシの塩基配列を BLAST探索し、相同性の高い多生物配列を抽出する

<input type="checkbox"/>	Eocanthecona thomsoni_mitochondrion_complete_genome	Eocanthecona th...	180	180	86%	3e-4	73.30%	5817	OP920755.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-B11_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	143	143	85%	4e-2	72.32%	658	MF750464.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG22537-G01_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	143	143	85%	4e-2	72.32%	658	MF744464.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-A11_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	143	143	85%	4e-2	72.32%	658	MF749911.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-D09_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	143	143	85%	4e-2	72.32%	658	MF745887.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-B07_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	143	143	85%	4e-2	72.26%	658	MF751917.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-A01_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	137	137	85%	2e-2	72.13%	619	MF750111.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-C05_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	137	137	85%	2e-2	72.13%	658	MF750633.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-B05_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	137	137	85%	2e-2	72.13%	611	MF744845.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-A06_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	137	137	85%	2e-2	72.13%	658	MF747945.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG22537-G03_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	137	137	85%	2e-2	72.13%	644	MF746993.1
<input type="checkbox"/>	Nearctodesmidae_sp_BIOUG26720-D05_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Nearctodesmidae...	137	137	85%	2e-2	72.13%	658	MF745430.1
<input type="checkbox"/>	Taeniopteryx_schoenemundi_isolate_G_DH2_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Taeniopteryx sch...	204	204	82%	2e-4	74.25%	634	MF458834.1
<input type="checkbox"/>	Taeniopteryx_schoenemundi_voucher_BC_ZSMAQU_00758_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mi...	Taeniopteryx sch...	204	204	82%	2e-4	74.25%	658	HQ563180.1
<input type="checkbox"/>	Taeniopteryx_schoenemundi_voucher_GBIFCH00194321_cytochrome_c_oxidase_subunit_1(COX1)_gene_partial_cds_m...	Taeniopteryx sch...	200	200	82%	2e-4	74.05%	658	OR733936.1
<input type="checkbox"/>	Taeniopteryx_schoenemundi_voucher_CROBD969_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Taeniopteryx sch...	198	198	82%	8e-4	74.05%	658	OK316363.1
<input type="checkbox"/>	Taeniopteryx_schoenemundi_voucher_CROBD959_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Taeniopteryx sch...	193	193	81%	4e-4	73.90%	658	OK316221.1
<input type="checkbox"/>	Taeniopteryx_schoenemundi_isolate_B300_cytochrome_oxidase_subunit_1(COI)_gene_partial_cds_mitochondrial	Taeniopteryx sch...	196	196	81%	3e-4	74.09%	525	MK584502.2
<input type="checkbox"/>	Branchinella_lyrifera_cytochrome_oxidase_subunit_1_gene_partial_cds_mitochondrial_gene_for_mitochondrial_product	Branchinella lyrifera	141	141	80%	1e-2	72.24%	639	AF308957.1

Query Cover
高いものを選ぶ

Per Ident
低いものを選ぶ

図5 BLASTより他の生物との配列を検索・抽出した表

実験方法

Query CoverとPer Ident とは

$$\text{Query Cover} = \frac{\text{一致した領域の長さ}}{\text{クエリ配列の長さ}}$$



どれくらいの範囲が比較されたか

$$\text{Per Ident} = \frac{\text{完全一致アミノ酸数}}{\text{比較されたアミノ酸数}}$$



比較した範囲の内どれくらい同じ配列か

Query Cover
高いものを選ぶ

Per Ident
低いものを選ぶ



基本構造は他生物と共通し、配列にはクマムシ特有の変化が示唆される他生物配列が示唆される

実験方法

3. それらをアミノ酸配列に変換し、AlphaFold2を用いて立体構造を予測する。
また、ProtelInferを用いて機能を推定する。

4. クマムシと他の生物のタンパク質構造を TM-alignで重ね合わせ、TM-scoreで算出する。

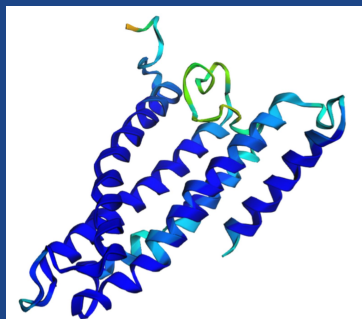


図6 AlphaFold2を用いて予測した立体構造

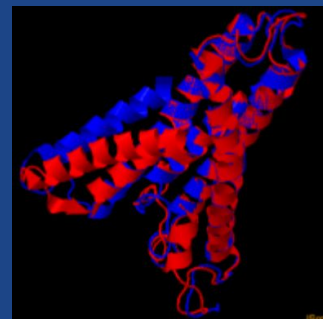
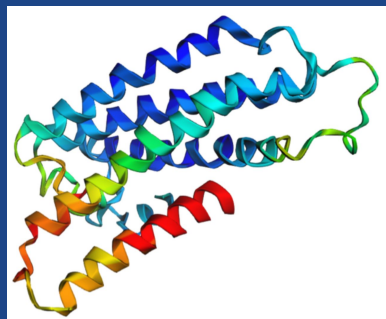


図7 重ね合わせた2つの立体構造

5. クマムシと他の生物を比較し、その構造的差異および機能予測結果を基に、
クマムシの分子的特性を考察する。

実験方法

<実験2>

1. 秦野市水無川沿いで採取したクマムシを同定する
2. DNAの抽出(簡易DNA抽出キット使用)
3. PCRでDNAを増殖する(プライマー使用)

以下はこれから実験

4. タカラバイオに依頼しシーケンサーにかける
5. 塩基配列からアミノ酸配列を推定する

以下は実験1同様

結果

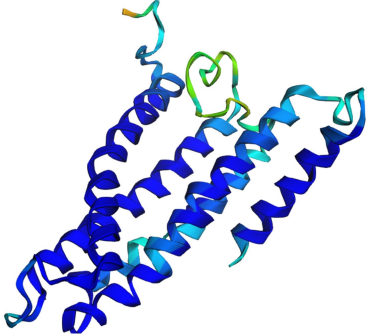
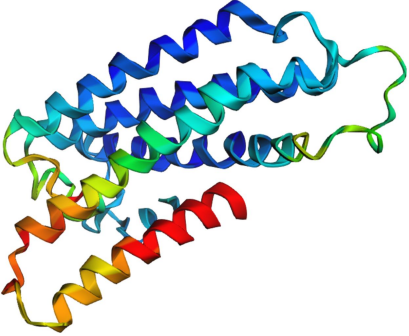
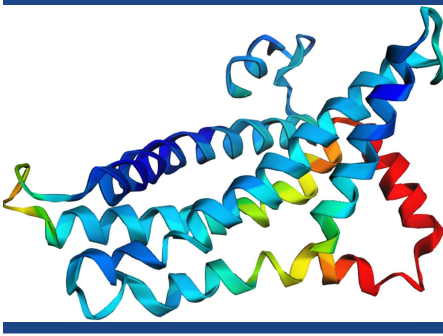
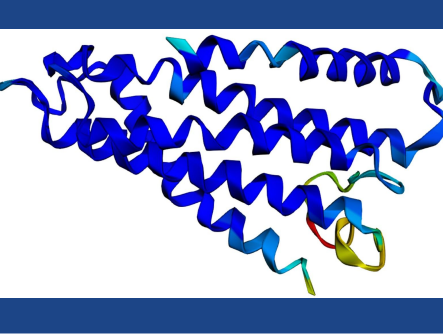
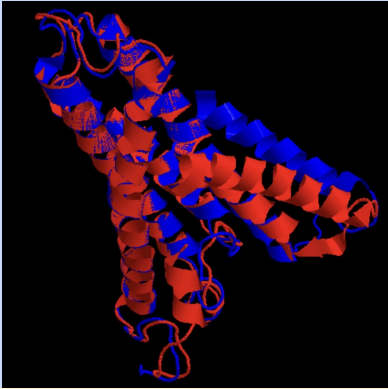
	Tardigrades(クマムシ)	millipedes(ヤスデ)	crustaceans(甲殻類)	flies(ハエ)
立体構造				
機能	<ul style="list-style-type: none">・膜の必須構成要素・クオラムセンシング・細菌型鞭毛基底小体・細胞膜・結合	<ul style="list-style-type: none">・膜の必須構成要素・トール様受容体 9シグナル伝達経路の調節・宿主細胞の細胞膜・細胞小器官を囲む膜・細胞内小器官の一部	<ul style="list-style-type: none">・膜の必須構成要素・酸化還元酵素活性・細胞内小器官の一部・細胞質の一部・細胞構成要素の構築・前駆代謝産物およびエネルギーの生成・酸化還元過程・光合成膜・細胞小器官の膜	<ul style="list-style-type: none">・膜の必須構成要素・細胞膜・無機陰イオン膜貫通輸送体活性・ATPアーゼ共役型膜貫通輸送体活性・膜タンパク質複合体

図8 クマムシ(HAMHAM1)とヤスデ、甲殻類、ハエの立体構造と機能

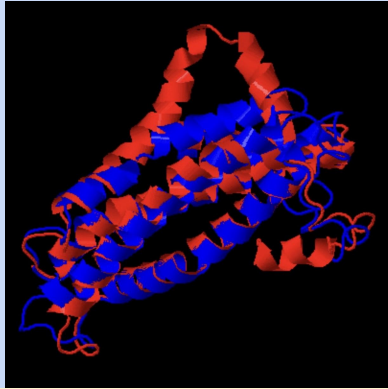
結果

millipedes (ヤスデ)



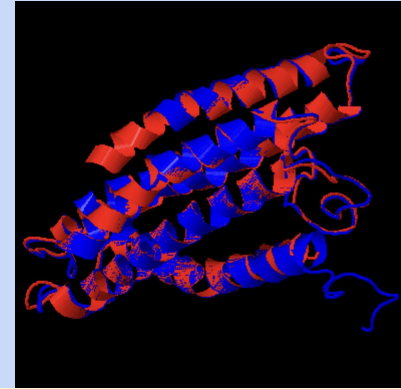
TM-score : 0.8494

crustaceans(甲殻類)



TM-score : 0.7849

flies (ハエ)



TM-score : 0.907

図9 HAMHAM1とヤスデ、甲殻類、ハエ由来タンパク質の比較

青: HAMHAM1

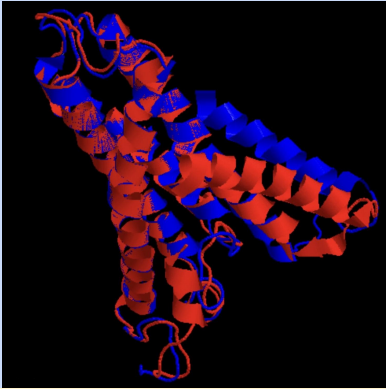
赤: 比較生物由来のタンパク質

※TM-score 基準

- 0.0-0.3 構造的相同性なし
- 0.4-0.5 部分的なドメイン相同性
- 0.5-0.7 フォールドレベルで類似
- 0.7-1.0 高度に保存された構造

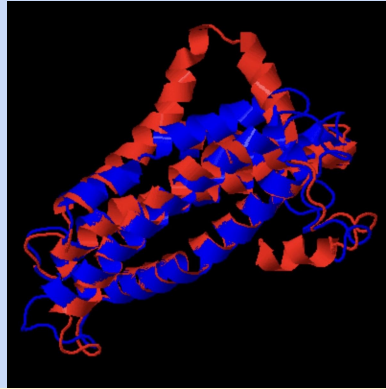
結果

millipedes (ヤスデ)



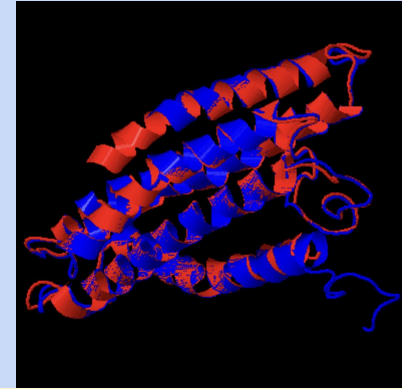
TM-score : 0.8494

crustaceans(甲殻類)



TM-score : 0.7849

flies (ハエ)



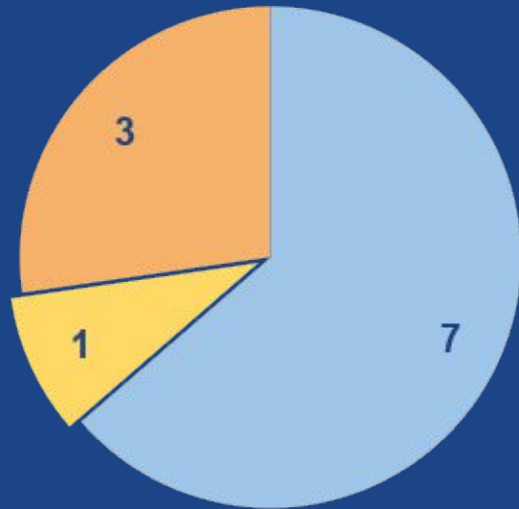
TM-score : 0.907

図10 HAMHAM1とヤスデ、甲殻類、ハエ由来タンパク質の比較

**HAMHAM1はヤスデ、甲殻類、ハエの 3種ともTM-score
は高い値を示し、進化的に保存された基本的構造を共有
していることが示唆される**

結果

Query”Tardigrade(クマムシ)”
によってヒットした配列の割合



- 細菌
- クマムシ
- その他の微生物・植物

図11 DDBJでQuery



図12 クマムシ由来の機能を持ったタンパク質の立体構造

機能: RBR型E3ユビキチン転移酵素

この機能はクマムシ由来の機能であると予測される

考察

共通の機能



立体構造の重なり部分

◁HAMHAM1と比較生物の構造重複領域(赤と青の共通部分)は**共通の機能が反映している可能性**がある

クマムシ特有の機能

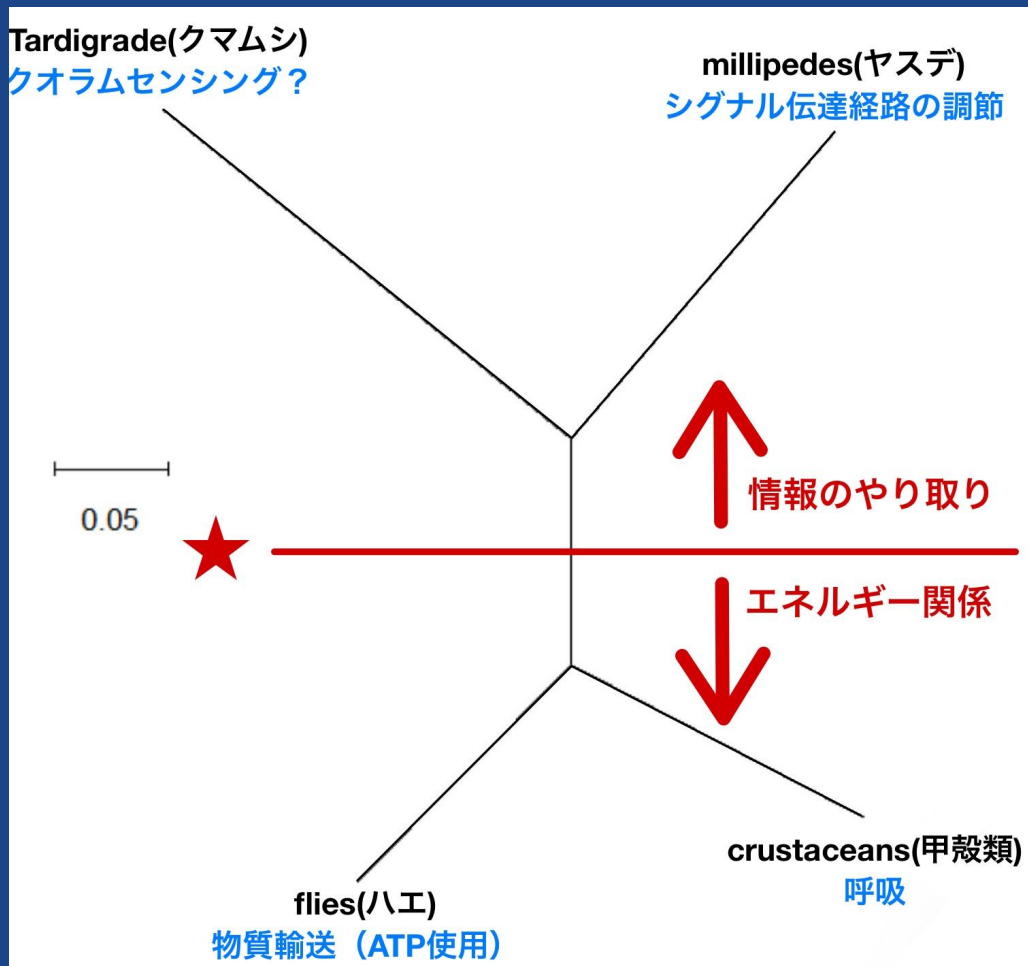


立体構造の青だけの部分

◁HAMHAM1の特異的な構造領域(青い部分)は**クマムシ特有の機能を担っている可能性**がある

考察

◀情報伝達



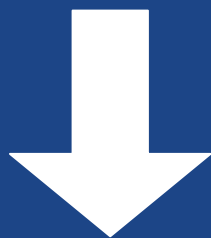
ATPを利用したエネルギー代謝 ▶

図13 系統関係と機能

考察

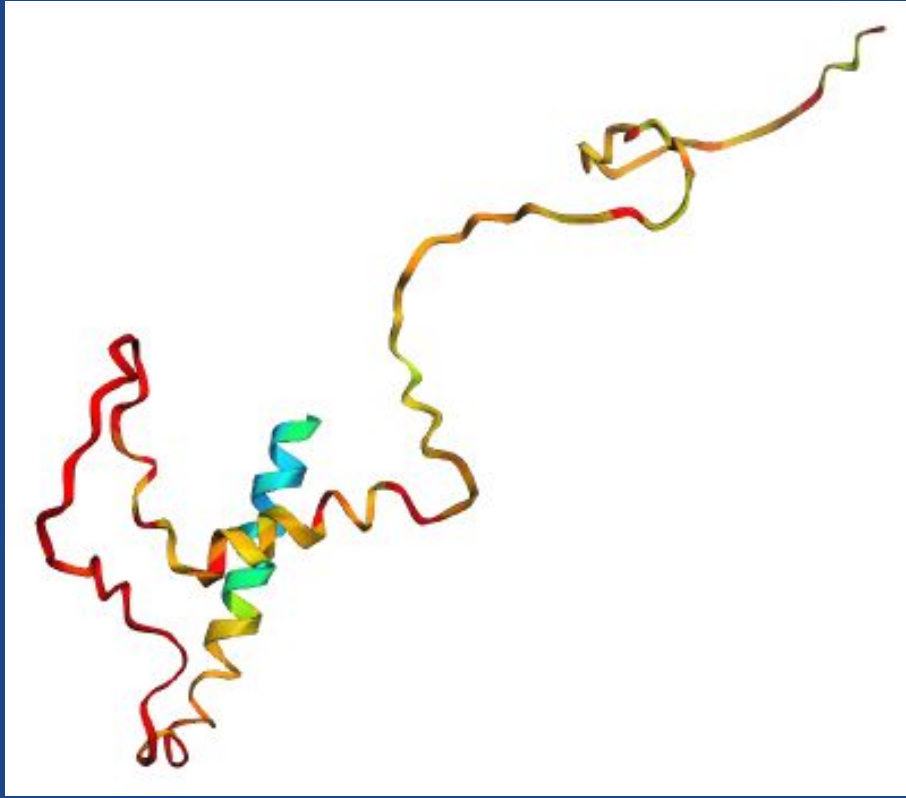
微小動物かたDNAを抽出する場合：

消化器官に残っている植物由来の DNAによるコンタミが起こってしまう

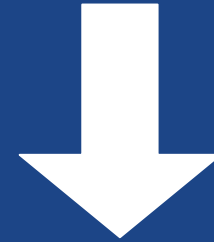


データベースに含まれている微小動物の遺伝情報には動物以外の遺伝情報が紛れ込んでいる

今後の展望



◀ **赤色**に近い色は立体構造の予測の信憑性が低い



立体構造の信憑性の低い部分の機能や塩基配列、アミノ酸配列などを確かなものへとしていく

図14 クマムシの由来と予測されるタンパク質の立体構造

今後の展望

DDBJ

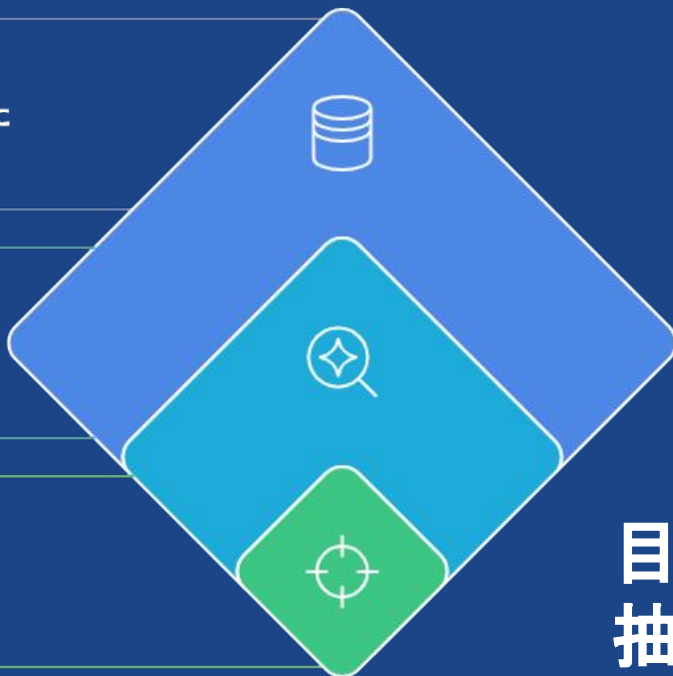
微小生物や他の生物が混合した
遺伝情報のデータベース

機能のふるい

得られた遺伝情報を機能の点
で評価する

目的の微小生物

最終的に目的の生物の
遺伝情報を抽出される



微小生物の遺伝情報
をデータベースには目的
の生物以外の情報が混
じっている



目的の生物の情報だけを
抽出できる
遺伝情報フリーベースを
「**宝の山**」に変えられる

図15 本研究の大まかな流れ

今後の展望

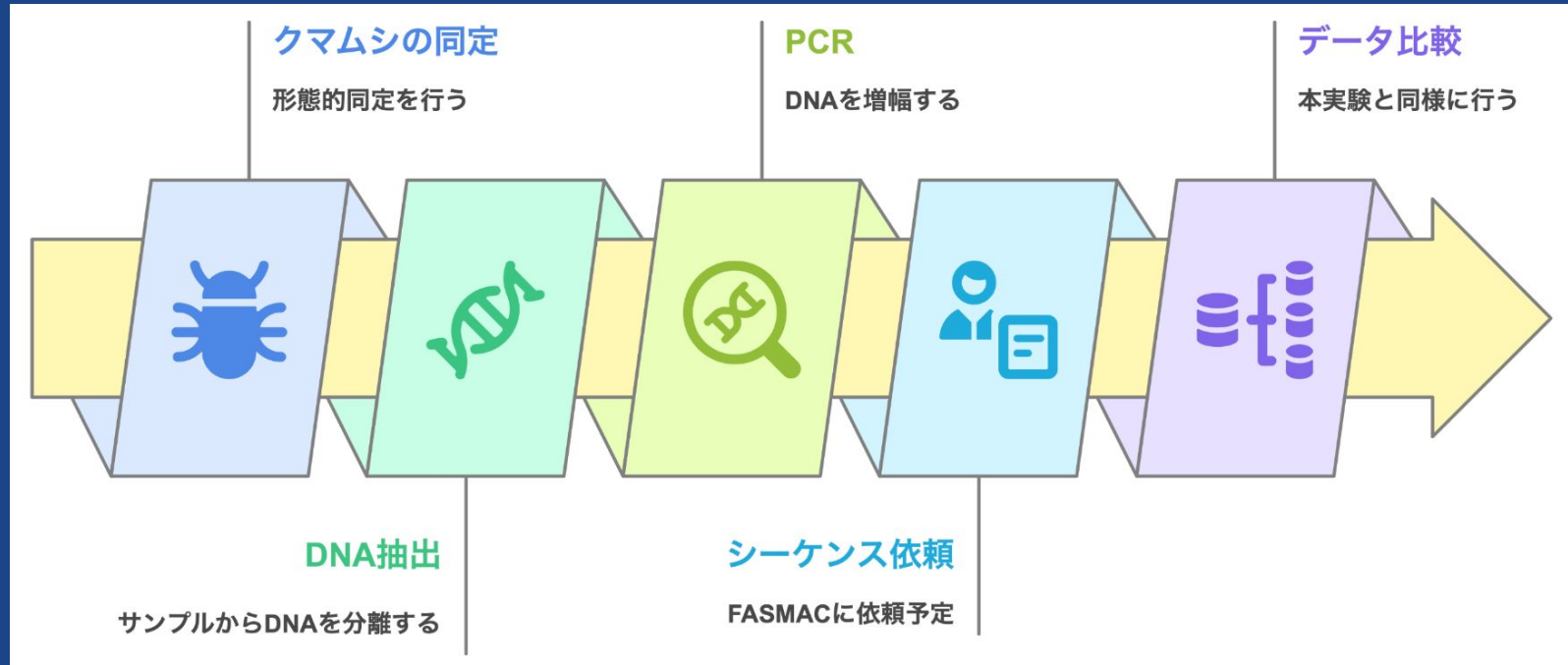


図16 今後の予定

- ・現在、3つ目のPCRまで完了している
- クマムシの耐性・乾眠に関わる分子機構を詳細に解析

謝辞

本研究を遂行するにあたり、
生物科

久保田宏先生

大塚電子株式会社

東京農業大学教授

高久康春先生

などたくさんの方々からご支援を賜りましたこと
を深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1)高木利久(2004)『東京大学バイオインフォマティクス集中講義』羊土社 出版
- 2)堀川大樹 荒川和晴(2015)『クマムシ:極限環境を生きる究極生物』慶應義塾大学湘南藤沢学会出版
- 3)Matteo Vecchi, Michele Cesari, Roberto Bertolani, K. Ingemar Jonsson, Lorena Rebecchi and Roberto Guidetti(2016)『Integrative systematic studies on tardigrades from Antarctica identify new genera and new species within Macrobiotidea and Echiniscoidea』CSIRO出版
- 4)青木淳一 (2015)『日本産土壌動物 分類のための図解検索 第2版』東海大学出版
- 5)中山広樹(2007)『バイオ実験イラストレイテッド ③本当に増えるPCR』秀潤社出版
- 6)中山広樹・西方敬人(2006)『バイオ実験イラストレイテッド ②遺伝子解析の基礎』秀潤社出版

参考文献

7) 田中 彬寛 中野 智美 渡邊 健斗 増田 和俊 本田 玄 秦 裕子 尾山 大明 柳澤 実穂 國枝 武和
2022 「クマムシ耐性タンパク質によるストレスに応答した細胞の硬化-究極生命体に向けて- カーズ
(CAHS)タンパク質の働き」

https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/about/press/page_00193.html (2025年6月16日最終閲覧)

8) 合同会社BxINFO「AlphaFold2を用いたタンパク質立体構造予測」

<https://olvtools.com/documents/alphafold2> (2025年6月6日最終閲覧)

9) 産総研マガジン「2024年ノーベル化学賞「タンパク質設計と立体構造予測」とは？」

https://www.aist.go.jp/aist_j/magazine/20241211.html (2025年6月6日最終閲覧)

10) TogoTV 米澤奏良 小野浩雅

「ProteinInferを使ってアミノ酸配列からタンパク質の機能を予測する」

<https://togotv.dbcls.jp/en/20230624.html> (2025年6月6日最終閲覧)