

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18811

研究課題名(和文) 昆虫嗅覚感覚毛クチクラに学ぶ防水通気性ナノポア構造の形態制御機構

研究課題名(英文) Morphogenetic mechanisms of the waterproof breathable nanopore structure on insect olfactory sensilla

研究代表者

安藤 俊哉 (ANDO, Toshiya)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・助教

研究者番号：10709744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、表面張力により液体の漏洩を防ぐと同時に気体の透過を促す特性を持つ、昆虫の嗅覚感覚毛の多孔性外骨格(クチクラ)の自律形成機構を分子レベルで解明し、生物規範に基づく機能性新材料開発に役立つ分子の物性及び動態に関する知見を得ることを目指した。クチクラの形態形成過程の詳細な電子顕微鏡観察により、細胞表面に形成される電子密度の高い微細突起構造が分泌直後のクチクラと相互作用することが微細孔(ナノポア)の形成に重要であることが明らかとなった。さらに、遺伝学的なスクリーニングにより同定した新規膜タンパク質Goxが、ナノポアの形成、特に突起の形成に必須だと推定される主要分子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, I analyzed the morphogenetic and molecular mechanism of autonomous formation of the waterproof breathable exoskeleton (cuticle) of insect olfactory sensilla, which plays essential roles in preventing leakage of liquid by surface tension and promoting odorant inhalation. I aimed to obtain knowledge on the physical properties and dynamics of molecules that lead to development of new functional biomimetic nanomaterial. Detailed electron microscopic observations of the morphogenetic processes of cuticle suggest that the cellular protrusive structures with high electron density formed on the cell surface interact with the cuticle immediately after its secretion, and form fine-scale pores (nanopores). Furthermore, my genetic screening identified a novel membrane protein gene which seemed to play major roles in the formation of nanopores, particularly in the process of the protrusion formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：昆虫 クチクラ 微細構造 ナノポア 嗅覚 形態形成 ショウジョウバエ バイオミメティクス

## 1. 研究開始当初の背景

1931年にクノールとルスカが電子顕微鏡を発明して以来、生体内のナノメートルレベルの微細構造が次々と明らかとなった。穴や突起、網目といった多様な形態の微細構造が重要な生体機能を担っている。腎臓の糸球体における細胞外微小孔は、血球の透過を制限する「ふるい」構造を形成する。光の波長と同程度の繰り返し構造は、色鮮やかな蝶の翅やクジャクの羽の構造色の形成に役立っている。数十 nm から、数百 nm レベルの微細構造単位は、タンパク質分子の大きさが 5 - 10 nm 程度であることを考えると、複数の分子が協調して複合体を形成することで構築されると考えられる。実際に、細胞内の微細構造に関しては、アクチン繊維や微小管などの細胞内の骨格構造の重合制御を中心に、形態形成過程における構成分子の動態とその形態制御機構が分子レベルで解明されてきている。一方で、「細胞外」の微細構造がどのように組織化し安定化するののかに関しては、その構成分子や形成過程の制御機構を含めて明らかになっていない場合が多く、その自律形成機構が解明されれば、機能的微細構造を持つ新素材の開発にも役立つと期待される。

本研究で解析対象とする昆虫の嗅覚感覚毛表面クチクラのナノポア構造も、生体に重要な機能を有する細胞外微細構造の一つである。ショウジョウバエの小顎鬚の場合、約 150 nm の間隔で直径 50 nm のナノポアが受容器表面に規則正しく並ぶ。クチクラの直下には嗅神経細胞の樹状突起が投射し、ナノポア構造は内部のリンパ液がしみ出すのを表面張力で防ぎながら、効率的に揮発性の匂い分子を透過させ、神経細胞表面へと運ぶのに役立っている。天然の防水通気性素材とも言うべきこの構造は、昆虫共通の機能的微細構造である。昆虫のクチクラは、主にクチクラタンパク質とキチンからなり、近年、ショウジョウバエの遺伝学や甲虫 *Tribolium* を用いた RNA 干渉実験によって、クチクラの層構造形成における個々のクチクラタンパク質の機能が明らかとなってきた。しかし、異なる性質のタンパク質が時間差で分泌されることで層構造が形成されるのは理解しやすいのに対して、ナノポア構造のようなクチクラ表面の格子状構造がどのように形成されるのか、また、どのように穴を開けるのかは明らかになっていない。

研究代表者は研究提案に先立って、ショウジョウバエ嗅覚器におけるナノポア形成過程の電子顕微鏡観察を行い、クチクラ分泌の初期に形成される数十 nm のサイズの膜状の「細胞外脂質膜構造」がナノポア形成の足場となることを見出した。クチクラ形成過程における細胞外脂質膜の役割については、これまで全く知見がなく、その分子実体や物性の理解が、細胞外基質におけ

る微細繰り返し構造形成機構を解明する上で重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

研究代表者が発見したナノポア形成の足場となる「細胞外脂質膜構造」を研究の起点とし、(1)足場となる脂質分子の同定、(2)足場の形成に関わる細胞内の供給経路の遺伝学的同定、(3)ライブイメージング法・超解像顕微鏡法によるナノメートルレベルでのナノポア形成分子の「動態」の可視化を行う。以上の解析により、生物規範に基づく新規機能性素材の開発に役立つ分子の物性・動態に関する知見を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞外脂質膜構造の構成分子の同定

エネルギー分散型 X 線分析 (EDS) による膜構造の元素分析と、脂質種特異的に結合・分解する脂質プローブ及びリパーゼを用いた電子顕微鏡観察に基づき脂質分子種の同定を行う。

### (2) 細胞外脂質膜構造の形成に関わる遺伝子の同定

脂質の合成・分泌制御経路、及びその調節に関わる遺伝子を主な候補としてナノポア形成に異常を来すショウジョウバエ変異体を探索する。並行して、ナノポアを持つ嗅覚感覚毛が消失する変異体と野生型のショウジョウバエを用いて比較トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行い、未知の分子を含めた網羅的な解析を進める。候補遺伝子の機能解析には、ゲノムスケールの RNA 干渉 (RNAi) 系統ライブラリーを利用する。電解放出走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) による形態観察を逐一行うことで、ナノポアの形成に異常を来す変異体をスクリーニングする。

### (3) ナノポアを支える細胞外・細胞表面分子の微細構造上での局在及び安定性の解析

脂質プローブ及び蛍光タンパク質でラベルした制御分子を利用してナノポア形成過程での分子の局在・動態を明らかにし、変異体の構造異常と照らし合わせて分子の機能を解明する。ナノポアの空間的微細繰り返しパターン (約 150nm) は光学顕微鏡の分解能の限界 (約 200nm) を超えているため、超解像顕微鏡法、免疫電子顕微鏡法を取り入れて局在解析を進める。分子の動態解析は、ライブイメージング法、蛍光褪色回復法 (FRAP 法) によって進める。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞外脂質膜構造の構成分子の同定

当初予定していた EDS の解析はノイズの

大きさから断念し、脂質プローブを用いた探索を行った。細胞外脂質膜構造に局在するマーカーは見つからなかったものの、細胞外脂質膜構造が形成される初期に細胞表面直下に局在するリン脂質として、ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸 (PIP2) を見出した。さらに、メッシュ状のアクチン細胞骨格も PIP2 が局在する細胞表面に共局在していた。今後検討の余地もあるが、古典的な電子顕微鏡観察から Plasma Membrane Plaque (PMP) と呼ばれる電子密度の高い、細胞表面に形成される微細繰り返し足場構造とその直下の細胞骨格が細胞外基質 (クチクラ) のナノポアの形成に關与する可能性が示唆された (図 1)。

## (2) 細胞外脂質膜構造の形成に關わる遺伝子の同定

細胞内の膜輸送制御に關わる制御因子を対象に、RNAi によるスクリーニングを行った。その結果、ナノポアの数が増加する変異体が複数同定され、そのほとんどが細胞外への脂質膜の切り出し制御に關わる因子をコードしていた。一方で、(1)の解析結果と透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態観察から、細胞表面に形成される PMP や脂質ラフト構造などの細胞表面の繰り返し構造と、細胞外マトリックス (クチクラ) との物理的な接触がナノポアの形成に重要であることが示唆された (図 1)。

そこで、ナノポア形成の時期に細胞表面に局在する膜タンパク質遺伝子を、RNA-seq 法により探索を行い、155 の候補遺伝子を同定した。実際に RNAi による機能阻害実験を進めたところ、ナノポアが全て消失する遺伝子が同定された。この新規遺伝子を *gox* と名付けた。

### ・ *gox* 遺伝子の機能解析

*gox* の RNAi 処理個体は全てのナノポアを消失しており、*gox* がナノポア形成に重要な主要な膜タンパク質をコードしていると考え、集中的に解析を進めた。*Gox* タンパク質は既存の機能ドメインを持たず、1つのシグナルペプチドと2つの膜貫通ドメインを持つと予測された。

ゲノム編集ツール CRISPR-Cas9 を用いて、*gox* 変異体を作成したところ、変異体の生育に特に異常はなく、嗅覚器の形態異常 (ナノポアの喪失、匂いに対する電気生理学的応答の著しい低下) の表現型のみを示した。このことから、*gox* は嗅覚器クチクラのナノポア形成に特化した遺伝子であることが明らかとなった。

*Gox* タンパク質の細胞内の局在を調べたところ、細胞表面や後期エンドソームを中心にドット状の局在を示していた。従って、*Gox* は、細胞表面へと輸送されて直接クチクラと作用する (図 1) もしくは、細胞表

面への PMP 構成分子の輸送を担う膜交通を制御することでナノポア形成を制御していることが示唆された。

## (3) ナノポアを支える細胞外・細胞表面分子の微細構造上での局在及び安定性の解析

ナノポア形成の足場を支える細胞表面分子として同定した PIP2 及び F-actin に対して、超解像顕微鏡法を用いて、その局在の可視化を試みた。STED、SIM、STORM、Airyscan といった原理と解像度の異なる超解像顕微鏡法を試み、STED、SIM、Airyscan がショウジョウバエの組織内での分子の可視化が可能であることが判明した。いずれの手法を用いた場合も、電子顕微鏡で観察された PMP と一致する間隔でこれらの分子が分布しており、細胞表面の PMP を光学顕微鏡で可視化できることが示唆された。一方で、その動態解析までは進んでおらず、今後、分子の動態解析を進めることで、その安定性を明らかにし、ナノポアの形成過程における PMP の役割を明らかにする必要がある。

一方で、ナノポア形成に關与すると考えられる最重要分子 *Gox* が同定されたのが研究終了の直前であったため、蛍光タンパク質を融合させた *gox* genomic レスキューコンストラク導入系統を含むイメージングのための組換えショウジョウバエ系統と、ゲノム編集を利用した変異体の作成するに止まっている。今後、これらの系統を用いて、超解像顕微鏡法及びライブイメージング法を適用することで、ナノポア形成に必要な細胞内小器官や細胞骨格の微細な形態変化の動態の解明や、*Gox* を中心とした分子間相互作用の実体解明が期待される。

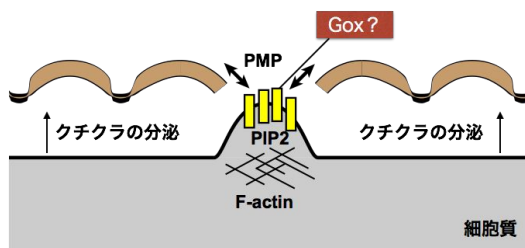


図 1 : PMP を足場としたナノポア形成モデル  
クチクラの分泌初期に電子密度の高い PMP を含む細胞表面の突起 (直径約 50 nm、PIP2 および F-actin を含む) が形成され、分泌直後のクチクラと相互作用し穴の前駆構造が形成されるといふモデル。本研究で同定した *Gox* タンパク質がクチクラと細胞間での相互作用を介する主要な分子であると推測される。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)  
なし

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Toshiya Ando, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi

Morphogenesis of nanopores in the apical extracellular matrix of *Drosophila* olfactory sensilla

18th International Congress of Developmental Biology, 2017年6月18日-22日、シンガポール国立大学、シンガポール・Lower Kent Ridge Rd

2. Toshiya Ando, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi

A novel transmembrane protein regulates nanopore formation in the cuticle of *Drosophila* olfactory sensilla

4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017年5月8日-11日、大阪大学、大阪府吹田市

3. Toshiya Ando, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi

Nanopatterning of cuticle: How to make nanopores on *Drosophila* olfactory sensilla

The 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016年9月9日-11日、立教大学、東京都豊島区

4. Toshiya Ando, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi

Nanopatterning of insect cuticle: How to make nanopores on insect olfactory sensilla

チョウの斑紋多様性の理解に向けた統合的アプローチ研究集会、2016年8月1日-3日、中部大学、愛知県春日井市

5. Toshiya Ando, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi

Morphogenesis of nanometer scale porous extracellular matrix on the insect olfactory sensilla

CDB symposium 2016 Size in Development Growth, Shape and Allometry, 2016年3月28日-30日、理化学研究所 CDB、兵庫県神戸市

6. 安藤俊哉、美崎佳寿代、米村重信、林茂生

昆虫嗅覚感覚毛クチクラの防水通気性ナノポア構造の形態形成

日本動物学会第86回大会、2015年9月17日、朱鷺メッセ、新潟県新潟市

7. Toshiya Ando, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi

Analysis on molecular mechanisms for morphogenesis of nanopore structure in extracellular matrix

第67回日本細胞生物学会大会、2015年7月2日、タワーホール船堀、東京都江戸川区

8. 安藤俊哉、美崎佳寿代、米村重信、林茂生

ショウジョウバエ嗅覚感覚毛クチクラのナノポア構造の形態形成

2015年度日本動物学会近畿支部研究発表会、2015年5月16日、奈良女子大学、奈良県奈良市

〔図書〕(計 0 件)  
なし

〔産業財産権〕  
なし

出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕  
新聞掲載

【理研CDBが語る】昆虫から微細加工技術を学ぶ...生物の構造や仕組みを真似た素材開発への応用も

毎日新聞神戸版 2016年2月21日

<http://www.sankei.com/west/news/160221/wst1602210004-n1.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤 俊哉 (ANDO, Toshiya)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・助教

研究者番号: 10709744

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし