

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630371

研究課題名(和文) 昆虫表皮タンパク質を用いたキチンファイバー積層構造材料の力学特性制御

研究課題名(英文) Mechanical property regulation of chitin fiber based structural material using cuticle proteins from beetle

研究代表者

新垣 篤史 (Arakaki, Atsushi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10367154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体はやわらかい組織を保護するため、有機分子から成るしなやかで軽量かつ高い強度を有する外骨格を形成する。近年、これらの材料としての優れた特性が明らかにされており、その構造が材料分野において注目を集めている。本研究では、ニホンカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* の硬組織の一つである上翅の硬化過程に着目し、硬化に関与するタンパク質の同定を目的とした。羽化後の上翅に発現するタンパク質の比較解析から、硬化に伴い発現量が増加する複数の新規タンパク質を同定した。今後これらのタンパク質の機能が明らかにされることにより、生体材料の特徴を有する高強度材料の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to protect soft body from foreign enemies, organisms form hard tissue layered by hierarchically assembled organic components. Because of their unique mechanical properties, the structures have recently received a lot of attentions in the field of materials science. In this study, we focused to study proteins involved in sclerotization of epidermal cuticles from *Trypoxylus dichotomus*. By the comparative analysis of sclerosing and non-sclerosing cuticles of elytra, several novel proteins most likely to be involved in sclerosing process were identified. The principle of protein function will be used for the development of hard materials which show the properties of biological hard materials.

研究分野：生物工学

キーワード：硬組織 タンパク質 キチン バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

宇宙・航空機をはじめとする多様な産業分野において、軽量で優れた機械特性を有する材料の探索や開発が求められている。生体はやわらかい組織を保護するため、有機分子の積層によりしなやかで軽量かつ高い強度を有する外骨格を形成するが、近年、これらの材料としての優れた特性が明らかにされており、その構造が材料分野において注目を集めている<sup>1,2</sup>。昆虫の外骨格もその一つであり、軽量で炭素繊維強化複合材料にも匹敵する特性を持つ(密度 1.5 mg/m<sup>3</sup>、引張強度 300 N/mm<sup>2</sup>、ヤング率 100 GPa)ことから、その構造を模倣した材料の開発が提案されている<sup>3,4</sup>。外骨格の構造は、表面から順に表皮、真皮、基底膜に分けられるが、優れた機械的強度は 200 μm 以上の厚さを持つ表皮に由来する。その構成成分はタンパク質とキチンが約 90% を占めており、これらが最適な配分で積層化し必要箇所の補強を行うことで、全体として優れた機械特性を獲得している。さらに興味深いのは、羽化後のわずかな時間において、表皮の形態及び強度が大きく変化する点である。このような変態に伴う表皮の構造変化には、表皮を構成するタンパク質の組成の変化ならびにキノン硬化の様式の変化が大きく関与していると古くから考えられている。近年、節足動物の一種であるダンゴムシの表皮の硬化がアスパラギン酸によって促進されることが示されており、酸性タンパク質が硬化のスイッチングに関わることが予測されている<sup>5</sup>。また、小型の甲虫において、キチンの配列に関わるタンパク質の存在が示唆されている<sup>6</sup>。しかしながら、表皮の層状構造の形成や硬化に関わるタンパク質は同定されておらず、表皮の構造が形成されるまでの分子レベルでの機構は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ニホンカブトムシ (*Trypoxylus dichotomus*) の硬化部位の 1 つである上翅の硬化過程で特異的に発現するタンパク質の同定を目的とした。*T. dichotomus* は飼育方法が確立されており、個体が大きく頭角、胸角、上翅など多様な硬化部位の分解が容易なため研究に適している。近年上翅は軽量かつ強度があると考えられており、軽量化複合構造または薄肉構造の設計に向けて、上翅の 3 次元的構造解析や上翅上の位置ごとの強度試験がなされ、高強度材料として注目を集めている。本研究で *T. dichotomus* の多様な硬化部位のうち、上翅の硬化過程で特異的に発現するタンパク質をターゲットとした。これによって、キチンまたはキチン質表皮の硬化タンパク質の同定が期待される。また *T. dichotomus* の表皮に関するプロテオミクスは本研究が初めての

報告であり、生物を模倣した材料としてのキチンの利用に向けた知見の寄与が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 表皮の調製と構造の解析

本研究では、年間を通して調達可能な *T. dichotomus* を研究材料として使用した。*T. dichotomus* は特定の専門業者から購入することで、遺伝的系統の近い個体を使用した。ボディ各部の表皮タンパク質のプロファイルを明らかにするため試料を解剖し、頭角、脚部などの各部の硬組織を得た。化学的処理により真皮に存在する有機物を除去し、完全な表皮を得た。各部位から得られた表皮は、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。

### (2) 表皮からのタンパク質の抽出と分離

SDS 等の界面活性剤及び Urea 等のタンパク質変性剤を用いて、表皮に含まれるタンパク質を抽出した。またはキチナーゼを用いてキチンを分解することで、そこに結合するタンパク質を遊離させた。遊離したタンパク質はその他の生体高分子と遠心により分離した後、一次元及び二次元電気泳動により分離を行った。得られたタンパク質のバンド及びスポットを切り出し、の解析に用いた。

### (3) 硬化前後の表皮タンパク質の比較解析

羽化直後のカブトムシの上翅は白色で硬化が見られない。そこで、羽化直後の硬化前の翅と、成虫の硬化後の翅の表皮に含まれるタンパク質プロファイルの比較解析を行い、表皮の硬化に関わるタンパク質を探索した。の手法により、タンパク質の抽出と分離を行った。

### (4) タンパク質のアミノ酸配列決定と遺伝子の同定

(2)、(3) で得られたタンパク質は、N 末端アミノ酸シーケンス、及び LC/TOF-MS を用いたデノボシーケンスによって配列決定・同定を行った。また、既知の昆虫のゲノム情報を活用し、遺伝子の同定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 成熟上翅及び羽化後の上翅の切断面の走査型電子顕微鏡観察

成熟した *T. dichotomus* の上翅の切断面を観察したところ、上下 2 層の表皮が存在し、その間に支柱を形成していることが観察された(図 1)。また上の層に対して下の層は薄いため、上翅の強度は上の層及び支柱を主としていることが考えられた。

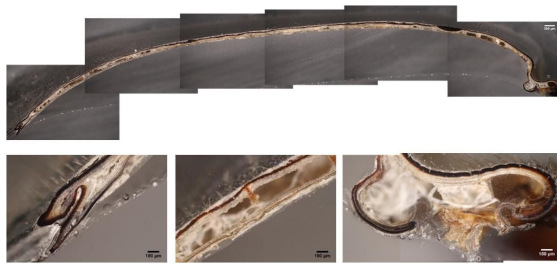


図 1. *T. dichotomus* 上翅の光学顕微鏡写真.

次に、羽化後 1 日目～8 日目の上翅の切断面を SEM により観察し、硬化過程にある上翅の表皮の変化を見た。1 日目～3 日目では層構造はなく、断面全体に不規則な状態が見られた(図 2)。4 日目及び 5 日目では切断面の外側と内側に異なるパターンの層が形成されているが、その境界が不明瞭であった。その後の 6 日目～8 日目では明確に区別される層が観察された。したがって上翅は羽化後に表皮に層構造を形成し、硬化することが確認された。

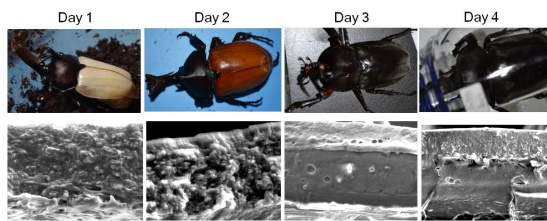


図 2. 羽化後 1 日目から 4 日目の *T. dichotomus* の写真(上)と、それぞれの上翅断面の SEM 写真

## (2) 上翅の硬化過程で発現するタンパク質プロファイルの比較解析

成熟上翅の切断面が上下 2 層とこの間をまたぐ支柱から成り、中空部には組織様の物質が見られた。そこで、上下 2 層におけるタンパク質プロファイルの違い、及び中空部の組織様の物質の有無におけるタンパク質プロファイルの違いを確認した。分離した上下層の可溶化画分のタンパク質プロファイルのバンドパターンは類似していることから、層によるタンパク質の差異は無いと考えられた。また、中空に残る物質によるタンパク質プロファイルに対する影響は無いことが確認された。そのため本研究ではサンプル量の確保のため上翅の全体を用いてタンパク質抽出を行うこととした。

羽化後 1 日目～8 日目の成虫の上翅を PBS buffer を用いて洗浄することで、可溶性タンパク質を含む上清画分を得た。この上清画分をアクリルアミド 15% の分離ゲルで SDS-PAGE を行い、1 日目～8 日目の上清画分のタンパク質プロファイルと比較したところ、バンドパターンはいずれも類似しており、特徴的なバンドは見られなかった。上翅の硬化に関与することが期待されるタンパク質は上翅の

硬化過程で特徴的に発現し、硬化が進行するにしたがって減退すると考えられる。したがって PBS によって抽出されるタンパク質は上翅の硬化と関係しない、表皮の表面に付着してキチンに作用しないタンパク質と考えられた。

羽化後、1 日目～8 日目の上翅の上清画分を十分抽出した後、1% SDS によって抽出した可溶化画分をアクリルアミド 20% の分離ゲルで SDS-PAGE を行い、1 日目～8 日目の可溶化画分のタンパク質プロファイルと比較したところ、1 日目の 24 kDa 付近に極端に太いバンドが見られた(図 3)。このバンドは急減退し、4 日目以降では見られなくなった。2 日目及び 3 日目では 15 kDa 付近にバンドが見られ、このバンドは 4 日目以降消失している。4 日目～8 日目の 20 kDa、10 kDa、8.5 kDa 付近に見られるバンドは 1 日目のプロファイルには見られず、硬化過程において特異的に発現するものと考えられた。特に 3 日目の 8.5 kDa 付近に、他のレーンに比べて特に濃いバンドが見られた。以上のように羽化後の日数によってタンパク質プロファイルが変化することが確認され、1% SDS で煮沸して得られた画分はタンパク質プロファイルの比較に適することが確認された。

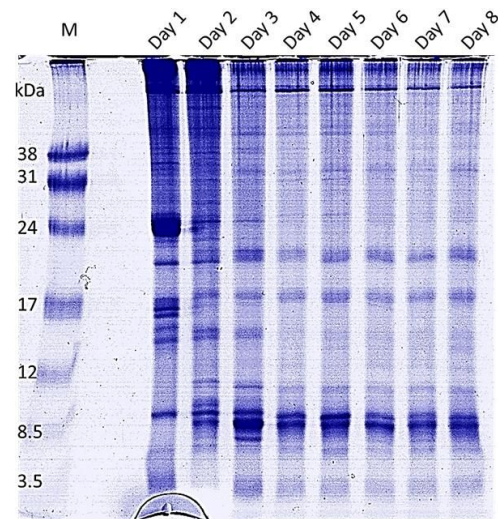


図 3. 羽化後 1 日目から 8 日目の上翅から抽出したタンパク質の SDS-PAGE.

上翅はキチンとタンパク質が相互作用して硬化するため、キチンを分解することでキチンと結合していたタンパク質が抽出されると考えた。そこで可溶化画分を十分に抽出した後の沈殿にキチナーゼを加えて得た可溶性の画分をキチナーゼ画分とした。これを SDS-PAGE で分離したところ、キチナーゼによるバックグラウンドが高いため、新たに抽出したタンパク質は確認されず、抽出方法としては不適であった。このことから、上翅からのタンパク質抽出には、上翅を PBS buffer で十分洗浄した後、SDS で煮沸処理する抽出手法を採用することとした。



### (3) 質量分析計を用いた表皮タンパク質の同定

羽化後 1 日目～8 日目の可溶性画分を SDS-PAGE で分離した結果、複数の特徴的なバンドが見られた。これらの特徴的なバンドをコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) のタンパク質のペプチドをデータベースとして質量分析を行ったところ、スペクトルとデータベース内のペプチドとの相関係数が既定値を外れていたことから同定できていないと判断した。したがって、選択したバンドは未知のタンパク質と考えた。

### (4) N 末端アミノ酸シーケンス解析に基づく表皮タンパク質の同定

硬化前の 1 日目には存在が確認されず、8 日目に出現するバンドを硬化に関与するタンパク質として選択し、N 末端アミノ酸配列解析を行った。しかし、単一のアミノ酸配列は得られず、これらのバンドには複数タンパク質が含まれることが示唆された。そこでさらにタンパク質を分離するために、IEF - SDS-PAGE の 2 次元電気泳動を行い、8 日目に現れた特異的な 3 つのスポットに対して N 末端アミノ酸配列解析を行った。その結果、それぞれのスポットに対して 30 残基の配列が得られた。得られた配列を BLASTP を用いて相同性解析を行ったところ、 $pI = 6.6$  のタンパク質スポットに対して高い相同性を示すタンパク質 (約 11.4 kDa、 $pI = 6.7$ ) が同定された (62.5% identity: 20/32 残基)。

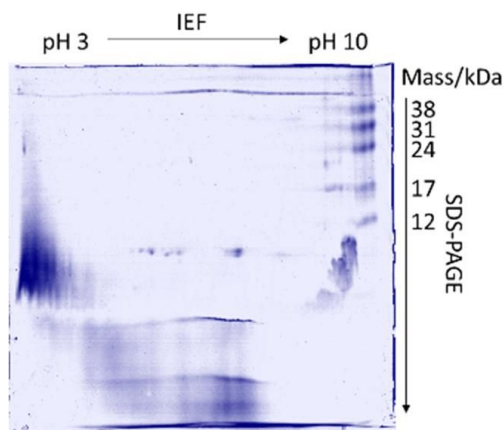


図 4. 羽化後 8 日目の上翅から得られたタンパク質の二次元電気泳動

同定されたタンパク質に対してさらに BLASTP を用いて相同性解析を行ったところ、甲虫由来のタンパク質以外には有意な相同性は認められなかった。したがって、本研究において分離・同定されたタンパク質は甲虫固有の新規タンパク質であることが考えられた。次に、有意な相同性が認められた甲虫由来のタンパク質のアミノ酸配列及び N 末端アミノ酸シーケンスで得られたスポットのアミノ酸配列を CLUSTALW を用いて整列化

した。その結果、タンパク質のアミノ酸配列から共通配列が見出された。今後、本研究で得られたタンパク質のアミノ酸配列を決定し、タンパク質の機能解析を行うことで、キチンに対する硬化過程における機能の解明と材料創製への応用が期待される。

### <引用文献>

- Ali Miserez, Todd Schneberk, Chengjun Sun, Frank W. Zok1, J. Herbert Waite, *Science*, **319**, 1816-1819 (2008).  
James C. Weaver, Garrett W. Milliron, Ali Miserez, Kenneth Evans-Lutterodt, Steven Herrera, Isaias Gallana, William J. Mershon, Brook Swanson, Pablo Zavattieri, Elaine DiMasi, David Kisailus, *Science*, **336**, 1275-1280 (2012).  
Yael Politi, Matthias Priewasser, Eckhard Pippel, Paul Zaslansky, Jürgen Hartmann, Stefan Siegel, Chenghao Li, Friedrich G. Barth, Peter Fratzl, *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 2519-2528 (2012).  
Jinxiang Chen, Juan Xie, Hong Zhu, Sujun Guan, Gang Wu, Mohammad N. Noori, Shijie Guo, *Mater. Sci. Eng.*, **C32**, 6113-618 (2012).  
Jinhui Tao, Dongming Zhou, Zhisen Zhang, Xurong Xu, Ruikang Tang, *PNAS*, **106**, 22096-22101 (2009).  
Yasuyuki Arakane<sup>1</sup>, Joseph Lomakin, Stevin H. Gehrke, Yasuaki Hiromasa, John M. Tomich, Subbaratnam Muthukrishnan, Richard W. Beeman, Karl J. Kramer<sup>1</sup>, Michael R. Kanost, *PLoS Genet.*, **8**, e1002682 (2012).

### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

中嶋直樹、新垣篤史、「ニホンカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* の表皮の硬化過程で発現するタンパク質の同定」、第 4 回 CSJ 化学フェスタ、2014 年 10 月 14 日、タワーホール船橋 (東京)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~biomol/>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

新垣 篤史 (ARAKAKI, Atsushi)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 10367154