

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2018～2019

課題番号：18H04758

研究課題名(和文)キチン繊維の3Dリアレンジメントが駆動する外骨格の変形

研究課題名(英文) Deformation of the exoskeleton driven by 3D rearrangement of chitin microfibrils

研究代表者

田尻 怜子 (Tajiri, Reiko)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特別研究員

研究者番号：70462702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の骨や昆虫のクチクラなど、生物の体の形をじかに規定する材料は、細胞の外に産生される基質から成る。生物の形づくりにおける細胞外基質の働きを探るために本研究では、モデル昆虫であるショウジョウバエの幼虫においてクチクラ自体の変形が体の形づくりを駆動する現象に注目し、クチクラのどの構成分子がどのように変形に関与するのか解析した。その結果、クチクラを構成するタンパク質の一つがクチクラを折り畳む仕組み、その折り畳み構造が後に引き伸ばされることでクチクラ全体が変形する仕組みが分かってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、細胞外基質は細胞から分泌されてその場に定着するだけの静的、受動的な材料とみなされがちであった。それに対して本研究では、細胞外基質を構成する分子がダイナミックにクチクラの構造をつくりだす仕組み、そしてその構造をもとにクチクラそのものがダイナミックに形を変えることで全身体型の形成を駆動することが分かった。生物の形はどのようにつくられるのか、という生物学の古典的、根源的な問いに対して新たな答えを提示する成果だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Organismal morphologies are often defined by extracellular matrices (ECMs) such as the vertebrate bones and the insect cuticle. To explore the roles of ECMs in morphogenesis, the present study focused on a cuticle deformation event that drives body shaping in a model insect, the fruit fly *Drosophila melanogaster*. I have found that a protein constituent of the cuticle induces cuticle folding, which later unfolds to enable deformation of the cuticle as a whole.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 細胞外基質 クチクラ 変形 クチクラタンパク質

1. 研究開始当初の背景

発生過程では組織がめまぐるしく形を変えていき、最終的な器官・体のかたちができあがる。細胞が生み出す力によって組織が変形して適切な形態に至る機構がこれまで盛んに研究されてきた。だが、生物の体を構成する材料は細胞だけではない。動物の体の形を規定する組織～脊椎動物の内骨格・昆虫の外骨格(クチクラ)など～は、主に細胞外マトリックス(ECM)から成る。ECMは細胞から放出されてその場に蓄積するだけの静的・受動的なものとみなされてきた。しかし、これらのECMの形こそが体の形そのものであることを考えると、体の形をつくりだす最も直接的な仕組みとして、発生過程におけるECMの変形に注目する必要がある。研究代表者はショウジョウバエにおいてクチクラそのものの変形によって全身の体型がつくりだされる過程に注目して研究を進めていた。ショウジョウバエの変態初期には、幼虫の細長い筒状の体型が1～2時間のうちに変化して、太く短いラグビーボール型の前蛹になる。この体型変化を駆動するのが、幼虫の全身を覆うクチクラの異方的な変形である。クチクラが前後方向に収縮すると同時に側方に伸長することによって、全身体型が劇的に変化する。

昆虫のクチクラではしばしば、セルロースに似た繊維状の多糖であるキチンが規則的に並び、堅固な3D構造を形成する。その代表例の一つが、平行に並んだ直線状のキチン繊維を含む平面が角度を変えながら重なるBouligand構造(ひねり合板構造)である。この構造は電子顕微鏡下で多数のアーチが平行に並んだパターンとして観察される。ショウジョウバエの変形する前の幼虫クチクラを調べるとアーチのうねりや反転が見られたのに対し、変形後のクチクラではアーチが規則的に並ぶパターンになっていた。これらの結果から、変形前のクチクラではキチン繊維が典型的なBouligand構造とは異なる特殊な配置をとり、変形の際に規則的なBouligand構造への変化が起こると考えられた。キチン結合性タンパク質Obstructor-E(Obst-E)はこのクチクラの構成分子の一つであり、クチクラの変形に必須である。obst-E機能欠損変異体のクチクラは、幼虫期にすでに規則的なアーチパターンを示した。そして、変態初期にクチクラの変形が起こらず、細長い体型のまま蛹になった。

以上のことから研究代表者は、変態初期に起こるクチクラ全体のマクロな変形は、ミクロなキチン繊維の立体的配置の変化(特殊配置から規則的Bouligand構造へ)の積み重ねとして説明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

クチクラ全体のマクロな変形は、ミクロなキチン繊維の立体的配置の変化の積み重ねとして説明される、という上記の仮説には、個々の細胞の動態にもとづいて組織全体の形態形成を説明しようとする近年の発生生物学の大きな潮流とのアナロジーがある。細胞動態を追跡して細胞の配置変化の向きや度合いを定量的に観測し、その観測データにもとづいて組織全体の形態形成を幾何学的に記述する、という研究が盛んに行われてきた。本研究では同様に実験と理論を組み合わせることで、クチクラ全体のマクロな変形を、ミクロなキチン繊維の配置変化から幾何学的に説明することを目的とした。

3. 研究の方法

変形前と変形後のクチクラについて超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡解析を行った。さらにキチン繊維の配置を効率よく観測することを目指し、原子間力顕微鏡による観察(本研究領域松尾グループ(大阪母子医療センター)との共同研究)を行った。クチクラの変形に必要なタンパク質Obst-Eのクチクラ中での局在について、高倍率レンズを用いた共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

クチクラ中のキチン繊維の立体的配置はこれまで、電子顕微鏡解析によって可視化されてきた。本研究でもまず、変形前と変形後のクチクラにおけるキチンの立体的配置の基礎データとして、透過型電子顕微鏡解析により多数の超薄切片画像を取得した。さらに松尾グループとの共同研究で、生体から取り出したクチクラをそのまま原子間力顕微鏡で観察することでキチン繊維の配置を可視化することができた。透過型電子顕微鏡解析のデータとの照合を進めたところ、当初の想定とは異なり、ミクロなキチン繊維の配置は変化しないことが示唆された。一方で、前述のように変形前のクチクラでアーチのうねりや反転が見られる。その整合性を検討するために、樹脂粘土を用いてBouligand構造の模型を作り、様々な角度で切片(切断面)を作製した場合にアーチパターンがどのように現れるかを解析した。その結果、模型中の繊維の局所的な配置が典型的なBouligand構造をとっていても、グローバルに模型全体を折り曲げると、多くの角度の切片でアーチのうねりや反転が見られるということが判明した。実際のクチクラの画像を見直すと、変形前のクチクラではキチン層がカーテンのプリーツのように折り畳まれた形状をとっていた。つまり、電子顕微鏡解析で見られていたアーチのうねりや反転は、グローバルにキチン層が折り畳まれていることの当然の幾何学的帰結であった、ということになる。

以上の結果によって、当初想定していたキチン繊維のミクロな配置の変化は実際には無視できると考えられた。代わりに、幼虫期のクチクラがプリーツ状に折り畳まれた構造になっており、変態初期にその折り畳み構造が展開されることによってクチクラ全体が変形する、ということが明らかとなった。したがって、クチクラの変形機構の鍵を握るのは

幼虫期のクチクラを折り畳む機構

変態初期にクチクラを展開させる機構

に絞られた。

前述のように変態初期のクチクラの変形には、このクチクラの構成因子の一つであるキチン結合性タンパク質 *Obst-E* が必要である。*obst-E* 機能欠損変異体では幼虫期にクチクラが折り畳まれず平板な形状になっていた。これらのことから、*Obst-E* が幼虫期にクチクラを折り畳む働きを持つと考えられた。*Obst-E* の C 末端に EGFP が融合した形で発現するトランスジェニック系統について、幼虫期から前蛹まで発生ステージを追ってクチクラを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、幼虫期にはクチクラの「山折り線」の中心に *Obst-E* が集積する様子、変態初期のクチクラの展開と同期して *Obst-E* の集積が解消される様子が見出された。これらの結果から、*Obst-E* タンパク質がクチクラ中でキチンと結合しながらダイナミックに折り畳み構造を作り出し、変態初期には何らかの因子が *Obst-E* の集積レベルを低下させることによってクチクラの展開を誘導すると考えられた。クチクラは従来、表皮から産生されたキチンとクチクラタンパク質がその場に定着しただけの静的・受動的な基質だとみなされてきたが、本研究ではその固定観念をくつがえし、クチクラの中で繰り広げられるタンパク質のダイナミックな働きによってクチクラそのものが変形するという新たな知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tajiri Reiko, Fujiwara Haruhiko, Kojima Tetsuya	4. 巻 4
2. 論文標題 A corset function of exoskeletal ECM promotes body elongation in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01630-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Reiko Tajiri, Haruhiko Fujiwara, Tetsuya Kojima
2. 発表標題 Whole body shape regulation by a single constituent of the apical ECM
3. 学会等名 The 13th Japanese <i>Drosophila</i> Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Tajiri, Haruhiko Fujiwara, Tetsuya Kojima
2. 発表標題 Control of whole body shape by a single constituent of the apical ECM in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田尻怜子、藤原晴彦、小嶋徹也
2. 発表標題 ECMの変形による形づくり：ショウジョウバエ外骨格を例として
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 富澤基金メモリアルイベント特別ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------