

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22248

研究課題名（和文）甲虫上翅のキチン繊維の配向制御機構の解析と構造材料開発への応用

研究課題名（英文）Analysis of chitin fiber assembling mechanism in beetle elytra toward development and application of structural materials

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）・教授

研究者番号：10367154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：甲虫の上翅は、外敵から柔らかい組織を保護するための防御機能を有する他、飛翔の際のバランサーの役割を果たしており、軽量さと頑丈さを併せ持つ材料として、航空機、ロボット等の産業分野において注目を集めている。本研究では、甲虫上翅の機械特性の向上に関わるドラスティックな表皮構造変化の分子機構の解明と材料開発への利用を目的としている。甲虫の上翅から同定された表皮タンパク質のアミノ酸配列による分類と上翅形成過程における遺伝子発現解析を行った。また、甲虫の上翅から同定された表皮タンパク質のキチン結合能解析とタンパク質を利用した材料作製を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、甲虫上翅の形成過程における構造の変化と、その変化に伴い発現するタンパク質を明らかにした。その結果、従来知られていなかった新しい表皮タンパク質のグループの存在を見出した。本研究の成果は、キチンとタンパク質のバイオポリマーを利用した軽量・高強度材料の開発につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：The upper wings of beetles, referred to as elytra, have a defensive function to protect soft tissues from foreign enemies and also serve as a balancer during flight. As a material having both lightweight and robustness, it is attracting much attention in industrial fields such as aircraft and robotics. This study aims to elucidate the molecular mechanisms of drastic structural changes involved in improving the mechanical properties of beetle elytra. We classified cuticle proteins identified from the beetle elytra by their amino acid sequences and analyzed the gene expression during the elytra formation process. We also analyzed the chitin-binding ability of the cuticle proteins and prepared materials using the proteins.

研究分野：生物工学

キーワード：タンパク質 キチン 甲虫 構造材料

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

航空機、ロボット等の産業分野において軽量かつ優れた機械特性を持つ材料の探索や開発が求められている。甲虫の上翅は、外敵から柔らかい内部組織を保護するための防御機能を有する他、飛翔の際のバランサーの役割を果たしており、軽量性と頑丈さを併せ持つ材料として、材料分野において注目を集めている (Chen et al., *Mater Sci Eng C* 32, 6113-6118 (2012); Zaheri et al., *Adv Funct Mater*, 28, 1803073 (2018))。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、無機成分はほとんど含まれない。羽化した直後の上翅は白色で柔らかく、キチン繊維の配向が不明瞭な一枚の板状構造を取っている。その後、24 時間ほどのわずかな時間に黒色を帯び、硬化する。この時、上翅内部では、上層・裏層が厚くなるのと同時に柱状構造が立ち上がり、空洞部を有する 3 次元構造が形成する。また、表皮内ではキチン繊維が規則的に配向したマイクロ構造が形成する。この上翅の急激な構造変化は、表皮細胞から分泌されるキチンとタンパク質の自己組織化によるものと考えられるが、その分子機構は現在のところ全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、甲虫上翅の機械特性の向上に関わるドラスティックな表皮構造変化の分子機構の解明を目的とした。試験には、年間を通じての飼育が可能で、比較的サイズが大きいことから外骨格の観察が容易なニホンカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* (胴体部分の長さが約 5 cm) を研究材料として使用した。近年上翅は軽量かつ強度が高いと考えられていることから、軽量化複合材料の設計に向けて、3 次元構造解析や強度試験がなされており、高強度材料として注目を集めている。よって、*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。本研究では、*T. dichotomus* 上翅構成成分及びタンパク質の詳細解析により、上翅のキチン繊維配向制御に関わるタンパク質の同定、及びタンパク質を用いたキチン繊維の配向制御プロセスの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 上翅表皮の構造変化の解析と成分分析

T. dichotomus の生体は特定の専門業者から幼虫を購入することで、比較的遺伝子系統の近い個体を実験に使用した。幼虫は 1 個体ずつボトルに分け、使用時までには 10°C で保管し、実験に使用する際は 28°C の環境で飼育した。羽化後、経過時間の異なる生体 (0-192 時間) からそれぞれ上翅を分離し、断面を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。また、成分分析には、分離・超音波洗浄を施した上翅を使用し、脂質含量、タンパク質含量、及びキチン含量を測定した。

(2) 上翅表皮からのタンパク質の分離と同定

上翅からのタンパク質の分離には 1% SDS 溶液を用いた。羽化後経過時間の異なる上翅からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE によりタンパク質プロファイルの比較を行った。さらに、効果前後の上翅から抽出したタンパク質を nano HPLC-MS/MS を用いて同定した。同定には、当研究室で取得した *T. dichotomus* のドラフトゲノム配列を用いた。硬化前後の上翅に存在するタンパク質を比較することで、キチン繊維配向制御に関わる表皮タンパク質を特定した。

(3) タンパク質の機能解析

上記 (2) で同定したタンパク質群の機能解析を *in vivo* 及び *in vitro* で行った。タンパク質のキチン結合能の解析に向け、大腸菌を用いた組み換え発現系により、(2) で同定したタンパク質群の組み換えタンパク質を調製した。調製したタンパク質及びキチンビーズまたはキチン粉末を混合した。遠心回収したキチンビーズまたはキチン粉末から 1% SDS 溶液でタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により結合能を評価した。

(4) キチン/タンパク質構造材料の作製

高分散性のキチンナノ結晶を用いて、フィルム状材料の作製を行った。キチンナノ結晶は溶液中で液晶挙動を示し、一定の配向性を有する。組み換えタンパク質添加の有無による材料構造へ与える影響を SEM 観察により評価した。

4. 研究成果

(1) 上翅表皮の構造変化の解析と成分分析

羽化後 0 時間、96 時間、及び 192 時間経過した上翅の SEM 観察を行った (図 1 A-F)。完全に成熟した *T. dichotomus* 上翅は、上下 2 層の表皮が存在し、その間に支柱 (Trabecula: Tr) を形成

する。さらに、成熟した上翅表皮層 (EDC) は外原表皮 (Exo) 及び内原表皮 (Endo) に大別される。成熟過程に伴った構造解析により、外原表皮は硬化前後で変化せず、内原表皮の層数が成熟に伴って増加する様子が確認された (図 1D-F)。また、羽化後 96 時間及び 192 時間経過後の上翅において全体の厚みが変化しなかったことから、支柱の伸長による上翅 2 層構造の形成が羽化後 96 時間経過時点までに完了することが示唆された。また、上翅成分分析の結果、成熟過程を通して、タンパク質の含有量はほとんど一定であり、成分比のみが変化している様子が確認された (図 1H)。また、キチン含量は成熟に伴って増加したことから、上翅に存在する表皮細胞及び体液循環によってキチン等の表皮材料が供給されていることが示唆された。

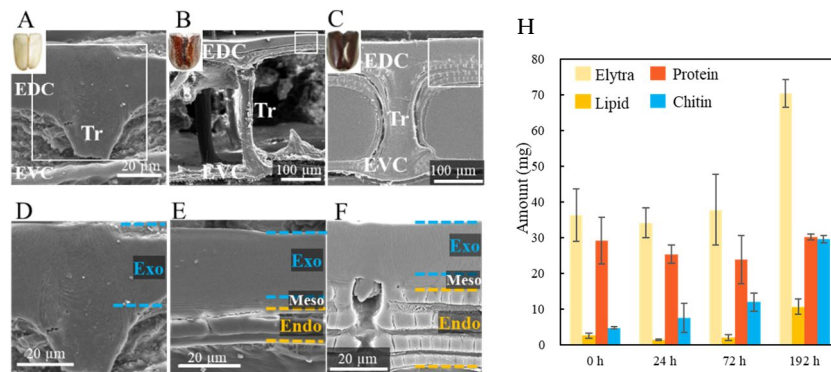


図 1 上翅断面の SEM 観察画像(A-F)及び上翅構成成分の変化(H)。 (A, D)羽化直後、(B, E)羽化後 96 時間、(C, F)羽化後 192 時間。Elytra は上翅全体の乾燥重量を示す。(Murata et al., *Acta Biomater.*, 140, 467-480 (2022))

(2) 上翅表皮からのタンパク質の分離と同定

上翅硬化過程各段階の上翅に含まれるタンパク質を可溶化し、タンパク質電気泳動を行った。その結果、時間経過に伴って存在量が減少するタンパク質 (図 2 白矢印) と、反対に増加するタンパク質のバンドが確認された (図 2 黒矢印)。存在量が減少したタンパク質については、硬化過程においてキチン繊維と強固に架橋することが考えられた。また、羽化直後および羽化後 8 日目の上翅に存在するタンパク質を同定した。その結果、羽化直後の上翅からは 25 種類、羽化後 8 日目の上翅から 16 種類の表皮タンパク質が同定された。そのうち、10 種類が両段階の上翅から同じく同定されたが、それ以外のタンパク質は各段階に特異的であった。表皮タンパク質は、表皮に存在する一群のタンパク質の総称であり、広く研究がなされている。その中で、表皮タンパク質のロックダウンが上翅構造に影響を与えたことが確認されており、上翅構造制御において重要な役割を持つことが示唆されている。よって、本研究において同定された合計 31 種類の表皮タンパク質の詳細解析を行ったところ、同定された表皮タンパク質中に特徴的なアミノ酸配列が存在することが明らかとなった (図 3)。羽化直後の未硬化上翅のみから同定された表皮タンパク質群においては、Gly に富んだアミノ酸配列が存在した。また、硬化前後の両段階の上翅から同定されたタンパク質群には Ala-Ala-Pro の反復配列が確認された。これらの配列領域は表皮タンパク質の持つキチン結合モチーフの前後領域に存在した。これらの配列的特徴が、表皮の硬化及び構造形成に関与することが考えられる。さらに、Gly に富んだ表皮タンパク質群 (グループ 1) 及び Ala-Ala-Pro の反復配列を有する表皮タンパク質群 (グループ 2) において、発現パ

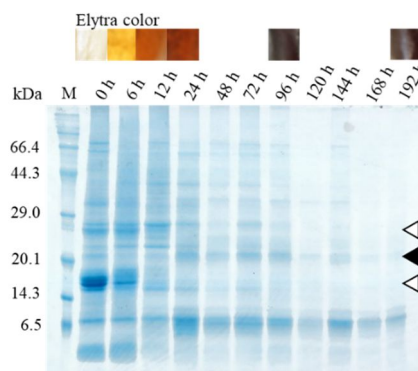


図 2 羽化後 0 時間から 192 時間におけるタンパク質プロファイルの変化。(Murata et al., *Acta Biomater.*, 140, 467-480 (2022))

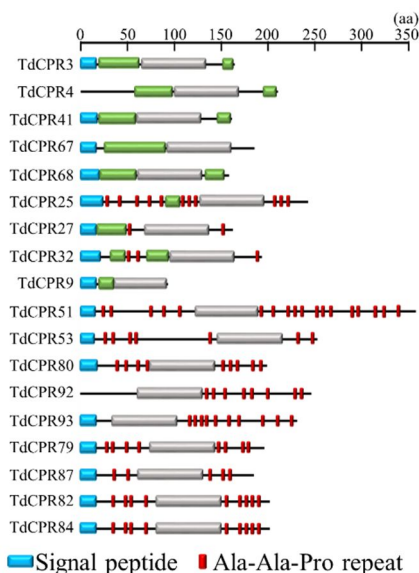


図 3 硬化前後の上翅から同定された表皮タンパク質の配列的特徴。(Murata et al., *Acta Biomater.*, 140, 467-480 (2022))

ターンが異なることを明らかにした。

さらに、上翅形成過程における表皮タンパク質遺伝子の発現挙動解析を行った。蛹化後 10 日目、12 日目、及び羽化後 0 日目、1 日目、4 日目、8 日目の上翅より RNA を抽出し、解析を行った。その結果、上翅成熟過程における発現パターンに基づき 3 グループに分類可能であることが示された。これらの結果は、上述のプロテオミクスの結果と相関が見られ、それぞれが上翅の異なる形成段階において発現し、異なる部位や構造の形成に寄与していることが示唆された。

(3) タンパク質の機能解析

グループ 1 及び 2 それぞれにおいて最も高発現なタンパク質について、大腸菌を用いた系により組み換えタンパク質を調製した。これらのタンパク質、及びキチンビーズもしくはコロイド状キチンを用いてそれぞれのリコンビナント表皮タンパク質のキチン結合能の評価を行った。比較として、バクテリア由来のキチン結合ドメインを用いてキチン結合試験を行ったところ、リコンビナント表皮タンパク質において、同等以上のキチン結合能が示された。本検討によって、甲虫表皮タンパク質のキチンへの結合能が示された。

(4) キチン/タンパク質構造材料の作製

高分散性のキチンナノ結晶を調製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、棒状形態を持つことが確認された。次に、キチンナノ結晶を用いてフィルム状材料の作製を行った。その断面を SEM によって観察したところ、甲虫表皮と同様な層状構造をなしている様子が確認され、キチンナノ結晶を用いた微細構造を持つキチン材料の作製に成功した。さらに、キチンナノ結晶及びリコンビナント表皮タンパク質を混合することによって、キチン/タンパク質構造材料を作製した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jesus Rivera, Maryam Sadat Hosseini, David Restrepo, Satoshi Murata, Drago Vasile, Dilworth Y Parkinson, Harold S Barnard, Atsushi Arakaki, Pablo Zavattieri, David Kisailus	4. 巻 586
2. 論文標題 Toughening Mechanisms of the Elytra of the Diabolical Ironclad Beetle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 543-548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-03106-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Anna Pohl, Steven A. Herrera, David Restrepo, Ryo Negishi, Jae-Young Jung, Chris Salinas, Richard Wuhner, Tomoko Yoshino, Joanna McKittrick, Atsushi Arakaki, Michiko Nemoto, Pablo Zavattieri, David Kisailus	4. 巻 111
2. 論文標題 Radular Stylus of Cryptochiton Stelleri: A Multifunctional Lightweight and Flexible Fiber-Reinforced Composite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mech Behav Biomed Mater	6. 最初と最後の頁 103991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2020.103991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Jesus Rivera, Satoshi Murata, Maryam Sadat Hosseini, Adwait A. Trikanad, Robin James, Allison Pickle, Nicholas Yaraghi, Nana Matsumoto, Wen Yang, Dilworth Y. Parkinson, Harold S. Barnard, Pablo Zavattieri, Atsushi Arakaki, David Kisailus	4. 巻 31
2. 論文標題 Structural Design Variations in Beetle Elytra	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2106468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.202106468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Satoshi Murata, Jesus Rivera, Mi Yong Noh, Naoya Hiyoshi, Wen Yang, Dilworth Y Parkinson, Harold S Barnard, Yasuyuki Arakane, David Kisailus, Atsushi Arakaki	4. 巻 140
2. 論文標題 Unveiling Characteristic Proteins for the Structural Development of Beetle Elytra	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 467-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.12.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田智志
2. 発表標題 キチン積層構造形成機構の解明に向けた甲虫上翅のプロテオーム解析
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jesus Rivera
2. 発表標題 Multiscale architectures in the exoskeletal armor of a crush resistant insect
3. 学会等名 TMS 2020 Annual Meeting & Exhibition
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田 智志, Jesus Rivera, David Kisailus, 新垣 篤史
2. 発表標題 ニホンカブトムシTrypoxylus dichotomus上翅のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田智志
2. 発表標題 キチン積層構造形成機構の解明に向けた甲虫上翅のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本生物工学会 東日本支部 第16回学生発表討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学生命工学科 生命分子工学・海洋生命工学研究室
<http://web.tuat.ac.jp/~biomol/index.html>

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
---------	---------