

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06243

研究課題名(和文) 昆虫クチクラに複数体節をまたぐ「切取り線」を形成するメカニズム

研究課題名(英文) Formation mechanism of the "cut here line" across multiple segments in insect cuticle

研究代表者

小嶋 徹也 (Kojima, Tetsuya)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：80262153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 昆虫を含む節足動物の脱皮や羽化の際、古いクチクラはランダムではなく「切取り線」となる部位で開裂する。ショウジョウバエでは3齢幼虫のクチクラが変化して蛹を包む囲蛹殻になるが、そのoperculum ridge (OR) が羽化の際に開裂する「切取り線」である。ORの構造やその形成におけるNotchシグナルの役割を解析した結果、予定OR領域の特殊構造やGlucose dehydrogenaseによる予定OR領域のORへの成熟、OR形成細胞の細長い形などのすべてがSerrate1によってOR形成細胞で活性化したNotchシグナルにより制御されることで、ORが形成されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クチクラの「切取り線」は、節足動物にとって生存に必須であるにもかかわらず、これまでほとんど研究されてこなかった。本研究成果は、「切取り線」の詳細な構造や形成過程、および、形成メカニズムについての分子レベルでの初めての研究となる。

「切取り線」は鋏角類、多足類、甲殻類、昆虫類などの節足動物の大きな分類ごとにそれぞれ決まった位置に形成され、さらに個々の種によってもその位置は細かく異なっている。したがって、本研究成果を基に他の昆虫や節足動物の「切取り線」についての研究をすることで、「切取り線」の一般的な理解だけでなく、「切取り線」の進化を通じた節足動物全般の進化過程の理解にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)： During a molt or eclosion of arthropods, including insects, the old cuticle is cleaved not randomly but at the "cut here line", a predefined line on the cuticle. In *Drosophila melanogaster*, the third instar larval cuticle transforms into the puparium, which encloses the pupa, and the operculum ridge (OR) serves as the "cleavage line" that is cleaved during eclosion. Through the analysis of the structure of OR and the role of Notch signaling in its formation, we found that Notch signaling plays a key role in the formation of OR by controlling the formation of the specialized structure at the future OR region, maturation of the future OR region to OR through activation of Glucose dehydrogenase, and regulation of the elongated shape of OR-forming cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：昆虫 クチクラ 切取り線 囲蛹殻 羽化 脱皮 Notch Gld

1. 研究開始当初の背景

昆虫をはじめとする節足動物の表面は、多糖であるキチン繊維と一群のクチクラ・タンパク質から構成される細胞外マトリックスの一種である、クチクラに覆われている。クチクラは外骨格として体を支えつつ個体を外界から守るための強固な構造であるが、その反面、伸縮性に乏しく、個体の成長に合わせて既存のクチクラを大きくすることはできない。そのため節足動物は、一定の成長段階ごと、あるいは変態時に、古いクチクラの下に新しいクチクラを作り直して古いクチクラを脱ぎ捨てる脱皮もしくは羽化をすることで、この問題を解決している。脱皮や羽化の際には、古いクチクラはランダムに破れるのではなく、必ず決まった部位で開裂する。つまり、クチクラにはあらかじめ「切取り線」となる部位がつくられている。脱皮や羽化は節足動物の根幹をなす生命現象であり、このような「切取り線」の形成は外骨格を有する生命システムにおける非常に重要な特徴である。したがって、クチクラの「切取り線」の構造や形成過程およびそのメカニズムについての理解は、節足動物という外骨格を有する生命システムを理解する上で欠かすことができない。しかしながら、これまで「切取り線」に関する研究は非常に乏しく、その構造や形成機構に関する分子生物学的な理解は、ほとんど進んでいない。また、「切取り線」は、昆虫種ごと、同じ昆虫種でも発生段階ごと、さらには、節足動物の大きな分類である鋏角類、多足類、甲殻類、昆虫類で、それぞれ特徴的な位置に形成されるため、「切取り線」の位置決定メカニズムを理解することは、節足動物の進化を考える上でも重要であるが、このことについてもまったくわかっていない。

ショウジョウバエは完全変態昆虫であり、蛹期を経るが、その蛹は終齢幼虫のクチクラが脱ぎ捨てられずに硬化した囲蛹殻に包まれている。羽化の際に、成虫は、頭部の額嚢を膨張させて囲蛹殻背側前方の operculum を押し上げて開口部を作り(図 1A-A'')、囲蛹殻から脱出する。この時の開裂部位、すなわち「切取り線」は胸部第 1 体節 (T1) から腹部第 1 体節 (A1) にかけて形成され、operculum ridge (OR; 図 1B, E) と呼ばれる。OR は T1 から A1 の前部区画までは前後軸に沿って形成されるが、前部区画と後部区画の境界部分で、背側と腹側に分岐する。

申請者は最近、OR ができる位置の表皮細胞で特異的に Notch シグナルが活性化していること(図 1C, F)、この活性化は 3 齢幼虫のクチクラが囲蛹殻になる前の 3 齢幼虫期に既にみられること(図 1D, G)、Notch シグナルの活性化には Notch のリガンドである Delta (Dl) と Serrate (Ser) のうち、Ser が必要であること、Notch シグナルの活性化を阻害すると、ショウジョウバエは羽化できないことを見出した。このことは、特定の表皮細胞で Notch シグナルが特異的に活性化することで、それらの細胞が OR 形成細胞として分化して直上のクチクラに OR という「切取り線」を形成することを示している。

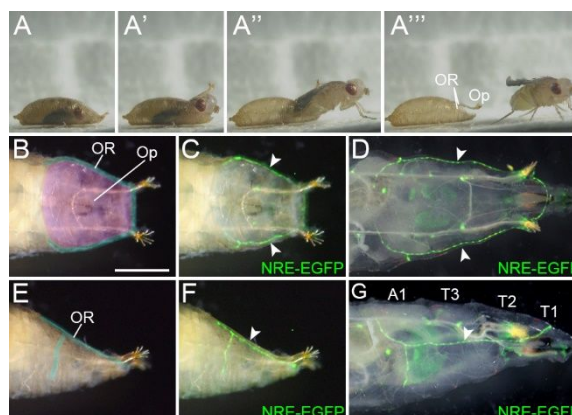


図 1. ショウジョウバエの羽化、OR、および OR 形成細胞

A-A'' : 羽化の様子。B, C, E, F : 囲蛹殻形成直後。D, G : 3 齢後期の幼虫。B-D : 背側から見た図。E-G : 横から見た図。NRE-EGFP は Notch シグナルの活性化をあらわす。すべての図で左側が前側、E-G では上側が背側。OR, operculum ridge; Op, operculum; T1-A1, 胸部第 1 体節 腹部第 1 体節

2. 研究の目的

本研究では、OR の構造や形成過程の分子レベルでの解析とそれらに対する Notch シグナルの役割を解析することで、クチクラに「切取り線」をつくる構造的・時間的・空間的なメカニズムを分子レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) OR の構造および形成過程の詳細な観察

OR の形成メカニズムを理解するためには、そもそも OR の構造や形成過程を知らなければならない。クチクラは、大まかには外側から内側にかけて、envelope, epicuticle, procuticle の 3 層から構成されており、キチンは主に procuticle に存在している。本研究では、Calcofluor White を用いたキチン染色によるキチンの様態解析、いくつかのクチクラ・タンパク質に GFP や EGFP が連結した融合タンパク質を用いたクチクラ・タンパク質の局在解析、超解像顕微鏡や透過型電子顕微鏡を用い観察によるより詳細な構造解析を行い、OR の構造や形成過程を調べた。

(2) Notch シグナルの OR 形成過程での役割の解析

(1)の観察に基づき、温度感受性変異体や RNAi 系統、強制発現系統を用いた遺伝学的手法を用いて、OR 形成細胞における Notch シグナルの活性を変化させて、その影響を解析することで、OR 形成過程における Notch シグナルの役割を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 予定 OR 領域の構造

上述したように、OR 形成細胞での Notch シグナルの活性化は、3 齢幼虫期には既に起こっている。これは、囲蛹殻が 3 齢幼虫のクチクラから形成されることを考えると自然であり、3 齢幼虫のクチクラが形成される過程で、将来の OR ができるための何らかの準備がされていると考えられる。キチン染色により 3 齢幼虫のクチクラを観察してみると、Notch シグナルが活性化している OR 形成細胞の直上のクチクラではシグナルが著しく弱くなっており、予定 OR 領域ではキチンの量が著しく減少していることがわかった。超解像顕微鏡を用いてこの部分をさらに詳細に観察すると、予定 OR 領域では、キチンがないわけではなく、微細な繊維状の構造をつくっていることがわかった。さらに、電子顕微鏡での観察からは、周囲の規則的なクチクラ構造のパターンが、予定 OR 領域では途切れており、不定形に見える特別な構造をしていることもわかった(図 2、図 4 右上)。

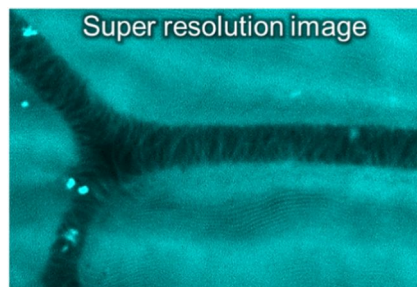


図2. 予定 OR 領域特異的なキチン染色パターン

A1 での分岐部分の超解像顕微鏡による観察。

さらに、epicuticle に局在する Tubby (Tb)、procuticle に局在する Obstructor-E-a (Obst-E-a)、epicuticle と procuticle の境界部分で両者にまたがって局在する Cuticular protein 11A (Cpr11A)の局在パターンを調べたところ、Tb と Obst-E-a は周囲よりも予定 OR 領域で多く局在しており、Cpr11A は予定 OR 領域では局在が消失していることがわかった(図 4 右下)。

これらのことから、3 齢幼虫期に、予定 OR 領域では既に周囲とは異なる特別な構造を形成していることが明らかとなった。

(2) 予定 OR 領域の構造形成における Notch シグナルの役割

en-GAL4 を用いて各体節の後部区画で *Notch* もしくは *Ser* に対する RNAi を誘導したところ、キチン染色シグナルや Tb, Obst-E-a, Cpr11A の局在の予定 OR 領域に特異的なパターンが、後部区画で消失した。また、同様に *en-GAL4* を用いて *Ser* を強制発現して *Notch* シグナルを活性化させたところ、それに合わせて上記の特殊構造が形成された。さらに、OR 形成細胞特異的に *GAL4* を発現する 10G01-*GAL4* を用いて *Notch* の RNAi を誘導したところ、やはりキチン染色の特異的なパターンが消失した。これらのことから、予定 OR 領域の特殊構造の形成には、OR 形成細胞で活性化した Notch シグナルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) Gld と Notch シグナルの関係

Glucose dehydrogenase (Gld)は Glucose を Gluconolactone に変換する酵素であるが、活性染色により OR 形成細胞で活性が見られること、*Gld* の変異体では OR が開裂せずに成虫が囲蛹殻から羽化できないことが、既に報告されている。Gld と Notch シグナルとの関係を調べるために、上記と同様に Notch シグナルを変化させた場合の Gld の活性を活性染色によって調べたところ、予定 OR 領域での Gld の活性も、Notch シグナルに依存していることがわかった。さらに、*Notch* の温度感受性変異体と *Gld* の発現制御領域に *GAL4* をつないだ系統を用いた解析から、この制御は *Gld* の転写制御を介していることもわかった。一方、*Gld* 変異体では、OR 形成細胞での Notch シグナルの活性化には変化がなかった。したがって、Gld の活性も Notch シグナルによって制御されていることが明らかとなった。

(4) Gld の OR 形成における役割

Gld 変異体における予定 OR 領域でのキチン染色やクチクラ・タンパク質の局在パターンを上記と同様に調べたところ、驚いたことに、これらは野生型との違いは見られなかった。さらに、電子顕微鏡での観察においても、特に違いが観察されなかった。*Gld* 変異体での OR 形成過程の異常を明らかにするため、囲蛹殻形成後の OR の構造を観察した。OR 領域は、囲蛹殻形成後には簡単に開裂してしまうため、これまでの様に解剖してキチン染色などを行うのが難しかった。そこで、キチン結合ドメインを持つ蛍光タンパク質 ChtVis-Tomato を強制発現する系統を用いて、解剖なしに蛹期のクチクラを観察した。ChtVis-Tomato は Obst-E-a と同様に procuticle に局在し、3 齢幼虫期の予定 OR 領域では周囲よりも多く局在していた。しかし、蛹期の後期になると、多く局在していた部分がなくなり、OR 領域には大きな溝ができていることがわかった。興味深いことに、*Gld* 変異体では、蛹期の後期になっても多く局在している部分が残っており、おそらくこのことが OR が開裂しないことの原因だと考えられる。このことから、Gld は予定 OR 領域が最終的な OR に成熟する過程で働いていることが示唆された。したがって、Notch シグナルは、Gld の制御を介して、OR の成熟過程も制御していると考えられる。

(5) OR 形成細胞の特異的な形の Notch シグナルによる制御

細胞接着因子である Neuroglian に GFP が融合したタンパク質を発現する Nrg-GFP 系統を用いて表皮細胞の形を観察したところ、OR 形成細胞は、周囲の細胞に比べて、前後軸方向に非常に細長くなっていることがわかった(図3)。また、この特徴的な形は Notch シグナルを RNAi で阻害すると消失することから、Notch シグナルは、OR 形成細胞の特異的な形についても制御していることが示唆された。この細胞形態の制御は、OR が「切り取り線」として「線」上に形成されるために、重要であると考えられる。

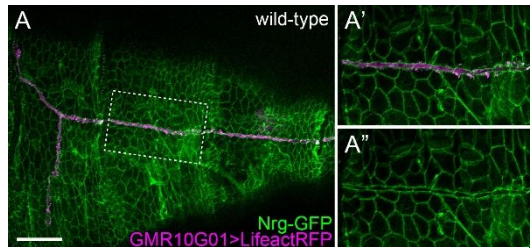


図3. 予定 OR 領域の特異的な形

A' と A'' は A の点線四角部分の拡大。OR 形成細胞はマゼンタ色で標識されている。

(6) 表皮細胞における Ser の発現パターン

この研究の途中で、Ser の発現パターンを忠実に再現して GAL4 が発現する系統が開発されたため、この系統を用いて、3 齢幼虫期における Ser の発現パターンを調べた。その結果、Ser は、T1 から A1 の前部区画では OR 形成細胞に接する背側の 2~3 細胞で発現しており、A1 の前部区画と後部区画の境界点からは、分岐した OR の後側で発現していた。このことから、少なくとも、T1 から A1 の前部区画と A1 の OR が分岐した部分では、Ser は独立の発現制御領域によって制御されている可能性が考えられる。

以上の解析から、Ser によって OR 形成細胞で Notch シグナルが活性化されることによって、予定 OR 領域に特別な構造が形成されるとともに、Gld の発現制御を介して OR の成熟過程も制御され、さらに OR 形成細胞の細長い形も制御されることで、「切り取り線」としての OR が形成されることが明らかとなった。

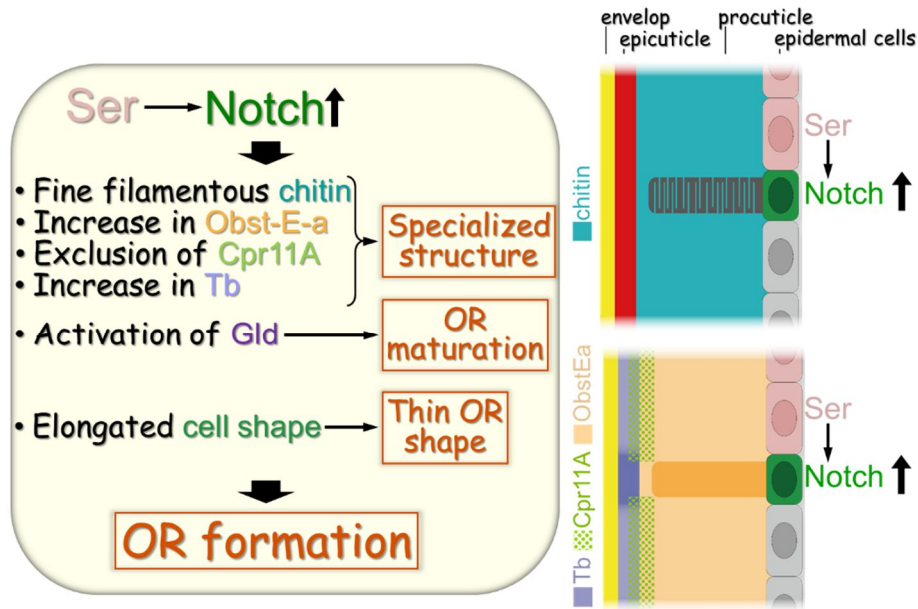


図4. OR 形成過程での Notch シグナルの役割 (左) と予定 OR 領域の特殊構造 (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tajiri, R., Fujiwara, H., Kojima, T.	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 1-13
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 -

1. 著者名 Tajiri, R., Hirano, A., Kaibara, Y., Tezuka D., Chen, Z., Kojima, T.	4. 巻 in print
2. 論文標題 Notch signaling generates the “cut here line” on the cuticle of the puparium in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小嶋徹也
2. 発表標題 クチクラの「切り線」の特殊構造とNotchシグナルによるその形成メカニズム
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Reiko Tajiri, Haruhiko Fujiwara, Tetsuya Kojima
2. 発表標題 Formation of a larval “corset” structure by ECM proteins in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 日本発生物学会第55回大会
4. 発表年 2022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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuya Kojima
2. 発表標題 Characteristic structure of the "cut here line" on the cuticle and its formation by Notch signaling
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuya Kojima
2. 発表標題 Formation of the "cut here line" on the cuticle by Notch signaling
3. 学会等名 Institute for Protein Research (IPR) International Seminar "Towards controlling the Notch signaling pathway"
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小嶋徹也
2. 発表標題 Notchシグナルによるクチクラの「切取り線」形成メカニズム
3. 学会等名 Notch研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田尻 怜子、藤原 晴彦、小嶋 徹也
2. 発表標題 クチクラの異方的伸長がつくりだす昆虫の体型
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 貝原 侑弥、平野 彩花、田尻 怜子、小嶋 徹也
2. 発表標題 シヨウジョウバエ困蛹殻におけるoperculum ridge形成に関わる分子機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野 彩花・田尻 怜子・小嶋 徹也
2. 発表標題 シヨウジョウバエ困蛹殻の「切り線」である operculum ridge の形成メカニズム
3. 学会等名 第54回日本節足動物発生学会大会
4. 発表年 2018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
---------	---------