

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K06666
研究課題名(和文)細胞外基質の自己組織化が体のかたちを決める仕組み

研究課題名(英文)Body shaping by ECM self-organization

研究代表者
田尻 怜子(Tajiri, Reiko)

千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：70462702
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モデル生物であるショウジョウバエにおいて外骨格ECM(クチクラ)の変形が変態初期の全身体形の変化を駆動することに注目し、その変形のもととなる幼虫期のクチクラの折り畳みをつくりだすクチクラタンパク質の働きを解析した。その結果、クチクラタンパク質がクチクラの中で自らの性質に従って固有の動態を示すことを見出した。さらにこの研究の過程で、変態初期に起こるクチクラの変形の機構について示唆を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでECMは細胞から分泌されてそこに定着するだけの受動的・静的なものとなってきた。しかし本研究ではクチクラタンパク質が細胞外で、分子自身の性質にもとづいてダイナミックにクチクラを折り畳むことが見えてきた。生物の形がどのようにつくられるのかという古典的な課題に対して、従来の研究では個々の細胞の動態にもとづく説明がなされてきたのに対し、本研究の成果は細胞「外」におけるECM分子の動態という新しい答えを提示するものである。

研究成果の概要(英文)：The present study focused on the function of a cuticular protein that induces folding of the *Drosophila* larval cuticle, which later unfolds during the early stage of metamorphosis to drive a dramatic change in the whole body shape. It is found that the protein exhibits unique intra-cuticle dynamics that depends on its amino acid sequence. An unexpected result obtained in the course of this study has shed light on the mechanism of cuticle unfolding that occurs in early metamorphosis.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 ECM 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

生物の複雑で多様な形をつくりだす発生機構を明らかにすることは、生物学の最も古典的で根源的な課題の一つである。近年の発生生物学では、形づくりの過程、つまり組織がめまぐるしく変形して複雑な形態に至る過程を、一細胞レベルの動態（細胞の分裂、移動、個々の細胞の変形など）に分解して理解しようという取り組みが盛んに進められてきた。しかし実は、細胞集団の形と生物の形は必ずしも等価ではない。例えばヒトの骸骨やセミの抜け殻にはもはや細胞が存在しないにも関わらず、我々はそれぞれの生物の形をそこに見出す。つまり生物の形を直接的に規定するのは細胞そのものではなく、骨や殻、つまり細胞外マトリックス (ECM) なのである。こういった細胞「外」の材料の形をつくりだす仕組みこそが、生物の形を直接的に説明しうるはずだ。この未開拓の問題に対し、研究代表者は昆虫の殻（クチクラ）を題材として取り組んできた。

クチクラは表皮細胞から産生されるタンパク質とキチン（セルロースに似た直鎖状多糖）を主成分とする ECM である。研究代表者は本研究開始以前に、発生過程におけるクチクラそのものの変形が体のかたちをつくりだすケースを見出し、その変形がクチクラを構成する分子の一つに依存することを示していた。

ショウジョウバエが幼虫から蛹（前蛹）になる過程では、細長い幼虫の体型から太く短い蛹の体型への変化が起こる。この体型の変化は、幼虫の体を覆うクチクラそのものの変形（胴囲方向に伸びて前後方向に縮む）によることが分かった。クチクラの構造を詳しく調べると、幼虫の時期にクチクラは胴囲方向にカーテンのプリーツのように折り畳まれていたのに対し、前蛹では平らに引き伸ばされていた。幼虫期に形成されたクチクラの折り畳み構造が、前蛹になる際に引き伸ばされることで、あたかもカーテンのプリーツを展開する時のようにクチクラ全体が胴囲方向に伸びると考えられた。クチクラの変形が起こらず細長い体型のまま蛹になる変異体として *obstructor-E* (*obst-E*) 機能欠損変異体を見出した。*Obst-E* タンパク質は幼虫クチクラを構成するクチクラタンパク質の一つであった。*obst-E* 欠損変異体では幼虫期に既にクチクラが平らで、前蛹になってもクチクラ構造が変化しなかった。以上より、正常な個体ではクチクラの中にある *Obst-E* が幼虫期にクチクラを胴囲方向に折り畳む働きをもつと考えられた。

Obst-E は3つのキチン結合ドメインを持つ分泌タンパク質で、*in vitro* でキチン結合能を示す。キチンは表皮細胞の表面で合成され細胞外のみ存在するとされることから、*Obst-E* は細胞外に分泌された後でキチンに出会うはずである。では、細胞外でキチンと出会った *Obst-E* はどのように働くのか。*Obst-E* タンパク質の局在を追跡したところ、その局在が経時的に変化することが分かった。特にクチクラが折り畳まれ始める時期に *Obst-E* がクチクラの“折り目”に集積していたことから、*Obst-E* がクチクラを貼り合わせる“糊”として働く可能性が考えられた。*Obst-E* はキチンに結合する性質に加えて、クチクラの中で同じ分子どうし、あるいは scaffold となる別の分子との相互作用を介して集まる性質を持つと考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景にもとづき、*Obst-E* がクチクラの中で複数のキチンと結合しながら互いに集まることによってクチクラがたぐりよせられ、そこが“折り目”となってクチクラの折り畳み構造ができるという仮説を立てた。すなわち、細胞外で発揮される *Obst-E* 分子の2つの性質

- ・ キチンに結合する性質（以下、キチン結合能とする）
- ・ クチクラ中で集まる性質（以下、自己集合能とする）

によってクチクラの折り畳み構造がつくられるという仮説である。本研究ではこの仮説の検証を通じて、細胞「外」の形づくり機構の一端を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

Obst-E には2種類のスプライズバリエント (a, b) が存在する。2つのバリエントはN末端のシグナルペプチドを除くほぼ全長が独立したエキソンにコードされており、アミノ酸配列の共有部分はほとんど無いが、どちらも3つの type II キチン結合ドメインを持つ *Obstructor* ファミリータンパク質であり、比較的高い相同性を示す (図 1)。このように互いに強く関連する二つのバリエントタンパク質であるが、クチクラの折り畳み構造をつくる機能はバリエント a 特異的であることを以前の研究で見出していた。さらに、*in vitro* でのキチン結合能はバリエント a のほうが b よりも強いことが示唆された。少なくともバリエント a はクチクラの折り目に集合することを見出していたが、バリエント b の動態は不明であった。本研究ではこの2種類の

バリエーションタンパク質、およびその一部領域を入れ替えたキメラ分子を作製し、それらの性質（キチン結合能や自己集合能）と機能（クチクラを折り畳ませる機能）を照らし合わせることで、上記の仮説の検証を行うこととした。

領域の入れ替えは図1に示すようにキチン結合ドメインごとに行った。もとのバリエーション a, b および各キメラ分子を蛍光標識有り・無しでショウジョウバエ生体で発現させるコンストラクトを作製し、それぞれ生殖系列に導入してトランスジェニック系統を得た。各分子の自己集合能のアッセイとして、蛍光標識有りの各分子の発現を幼虫表皮で誘導し、クチクラ中の各分子の局在を観察した。またクチクラを折り畳む動きの強さを調べるために、*obst-E* 機能欠損変異体の幼虫において各分子の発現を誘導するレスキュー実験を行った。

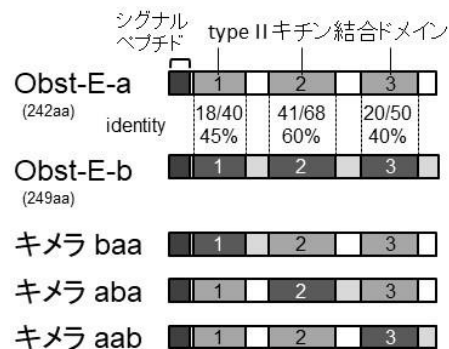


図1. *Obst-E* の二つのバリエーションと本研究で作製したキメラ分子

4. 研究成果

蛍光標識有りの各分子のクチクラ中での局在を観察した結果、キメラ分子ごとにクチクラ中で異なる局在パターンを示すことが分かった（図2）。特にキメラ aab はクチクラの折り目への顕著な集合を示さなかったことから、自己集合能が低いと考えられる。ただしそれがキチン結合能と独立するものなのか、あるいは自己集合がキチン結合に依存する機構があるのかは現時点では不明である。

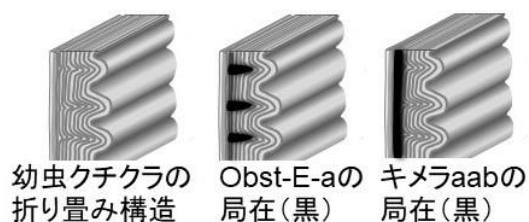


図2. *Obst-E-a* とキメラ分子の局在

obst-E 機能欠損変異体の幼虫において各分子の発現を誘導するレスキュー実験は以前の研究で *Obst-E-a* または *b* を発現する別のトランスジェニック系統を用いて行っていた。本研究では当初、同様のレスキュー実験を新たなトランスジェニック系統（染色体上の発現コンストラクト挿入位置を統一することによって発現量を揃えようと企図した）を用いて進め、蛹の体形の計測によって各分子の機能を見積ろうと計画していた。しかし今回作製したトランスジェニック系統を用いて *a* を発現させたところ、蛹の体形が *obst-E* 機能欠損変異体と同様あるいはそれ以上に細長い（すなわち一見するとレスキュー活性がまったく無い）という結果を得た。これは以前のトランスジェニック系統を用いたレスキュー実験とは異なる結果であった。詳細に調べたところ、今回のレスキュー実験でも幼虫クチクラの折り畳みは形成されていたことから、発現させた *Obst-E-a* は幼虫期に正常に機能していたと考えられた。そのうえで、本研究で新たに作製したトランスジェニック系統における *Obst-E-a* の発現レベルが以前用いた系統よりも顕著に高いことが示唆され、過剰量の *Obst-E-a* によって前蛹化時のクチクラの引き伸ばし過程に異常が生じたと考えられた。以前の研究で、野生型個体では前蛹化の際にクチクラ中の *Obst-E-a* が顕著に減少するという結果を得ていたことと合わせると、

- 野生型個体では前蛹化の際に何らかの機構でクチクラ中の *Obst-E-a* が減少することによってクチクラの折り畳み構造がほどけて引き伸ばし可能になる
- 今回のレスキュー実験では *Obst-E-a* の発現量が過剰だったために前蛹化の際に *Obst-E-a* が十分減少せず折り畳み構造がほどけなかった
- それによって幼虫から蛹への体形変化が阻害された

という可能性が考えられる。

以上のように本研究ではクチクラタンパク質 *Obst-E* が自身のアミノ酸配列にもとづいてクチクラ中で固有の動態を示すことを見出した。分子の性質と機能を結びつける解析は道半ばであるが、その解析の過程で、研究開始当初は想定していなかったクチクラの引き伸ばしを誘導する機構についての示唆を得た。細胞外における分子のふるまいが体の形を決める機構の手がかりを見出す成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 -

1. 著者名 田尻怜子	4. 巻 73
2. 論文標題 うじ虫の皮が体を形づくるしくみ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 348-352
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 無
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 -

1. 著者名 田尻怜子	4. 巻 58
2. 論文標題 クチクラの変形による昆虫の形づくり	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 36-39
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 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

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

1. 発表者名 Reiko Tajiri, Haruhiko Fujiwara, Tetsuya Kojima
2. 発表標題 Insect body shapes sculpted by cuticle deformation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Reiko Tajiri
2. 発表標題 ECM coating the Drosophila larval body acts as a “corset” that promotes body elongation
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田尻怜子
2. 発表標題 ショウジョウバエ幼虫の細胞外基質が体型を制御する機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田尻怜子
2. 発表標題 クチクラによる昆虫の形づくり
3. 学会等名 定量生物学の会 第十回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

幼虫の皮がコルセットとなりハエのスレンダーな体型をつくる
<https://www.k.u-tokyo.ac.jp/information/category/news/3903.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
---------	---------