

細胞外での分子の自己組織化による外骨格形成機構の解明と人工的再構成  
国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター 板倉 由季

## 1 研究の背景と目的

我々動物の体表は、体内環境の維持、外的ストレスに対する防御、外界との情報交換など多様な機能を持つ。特に表皮細胞より外側は、無細胞性のアピカル細胞外マトリクス、aECM で構成されており、哺乳類における角質層、魚類の鱗や粘液、昆虫のクチクラのように、aECM 構造の形状を変えることで最大限の機能を発揮している。生物の形態形成については、細胞の分化・移動・変形等による、細胞を主体とした機構が数多く明らかにされた。しかし aECM 形成は、細胞外に分泌された構成分子が主体となるため、全く異なる研究アプローチが必要とされ、これまで理解が進まなかった。

本研究はショウジョウバエの嗅覚毛で、初期の aECM—“ナノ薄膜”の構築に関与するとして同定した 2 種類の aECM 構成分子について、自己組織化に関わる性質、生体内での微細局在や人為的な発現量操作の影響を調べる。これにより aECM 構成分子によるナノスケールの構造形成機構を解明し、形態形成の理解を深めることを目的とする。また、医療分野や材料工学分野で役立つ、望ましい構造・機能をもつ ECM を作る技術の発展につながる知見を得ることも目的とする。

## 2 研究方法・研究内容

ショウジョウバエ外骨格のクチクラは三層構造で、最表層である約 20nm 厚の“ナノ薄膜”が最初に作られ、このパターンに従ってさらに他の二層が作られる (*PLoS Genet.* 12, e1006100, 2016[1], *Curr. Biol.* 29, 1512-1520.e6, 2019[2])。そこで本研究では、最も重要と考えられる、ナノ薄膜の構築過程に着目して研究を行う。

哺乳類の卵細胞を覆う aECM、透明帯 (Zona Pellucida, ZP) の構成タンパク質として同定された ZP タンパク質は、線虫からヒトまで広く保存されている。共通している ZP ドメインを介して重合し、様々な構造を作ると考えられている。申請者は本研究以前にショウジョウバエの ZP タンパク質全 20 種類を対象として機能解析を行い、ナノ薄膜構築に関わると考えられる 2 種類の aECM 構成分子—Trynity (Tyn), Dusky-like (Dyl) を同定した。幼虫期に致死となる Tyn 変異体では、表皮のバリア機能の低下が見られた。クチクラを観察すると、ナノ薄膜の構造が乱れており、Tyn がナノ薄膜形成を通じてバリア機能に必要とされることを示した。Dyl の変異体では、成虫の感覚毛クチクラが異常に脆いことが報告されている (*Development* 139, 906-916, 2012[3])。翅の発生過程では、Tyn, Dyl の遺伝子発現はナノ薄膜形成の時期に最も高い[1]。これらのことから、Tyn, Dyl は共にナノ薄膜の形成過程で働いている可能性があると考えた。表皮や、神経支配を受けない毛器官・小刺毛で見られる標準的なナノ薄膜は平らであるのに対し、嗅覚毛のナノ薄膜は湾曲したパターンを示す (図 1 上: Pupa の Cuticle)。窪

みの部分は後に除去され、成虫で匂い分子がクチクラ構造を通過するために必要な微細孔となる(図1下: Adult, 図2:上段)。このようにナノ薄膜の湾曲パターンと成虫での最終的なクチクラ構造の対応が明確であることから、嗅覚毛を対象として研究を行った[2]。

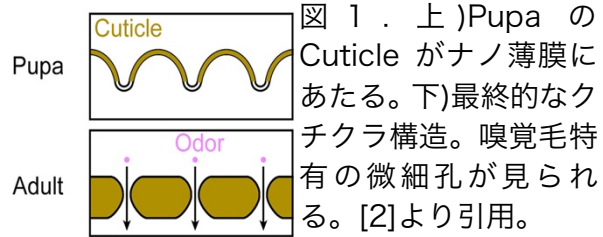


図1. 上)PupaのCuticleがナノ薄膜にあたる。下)最終的なクチクラ構造。嗅覚毛特有の微細孔が見られる。[2]より引用。

Tynの機能阻害を行うと、成虫の嗅覚毛クチクラで微細孔が消失した(図2中段)。一方、Dylの機能欠失型変異体ではクチクラ構造の崩壊が見られた(図2下段)。ナノ薄膜形成期の嗅覚毛で細胞外に分泌されたTyn, Dylの局在を調べると、Tynを外側・

Dylを細胞表面側として互いに分離かつ隣接した層を作り細胞を覆っていた(図3)。このパターンは小刺毛や、培養細胞でTyn, Dylを強制的に発現させた際にも観察されたため、分子そのものに備わった性質によって生み

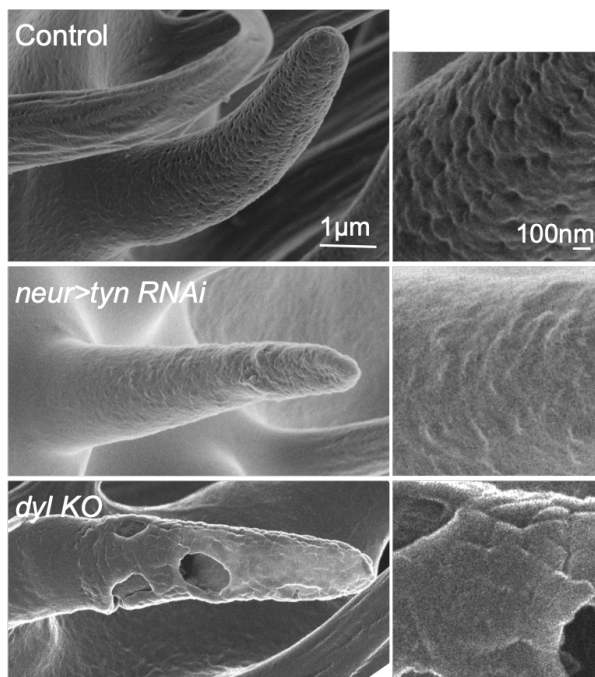


図2. 嗅覚毛の最終的なクチクラ構造。

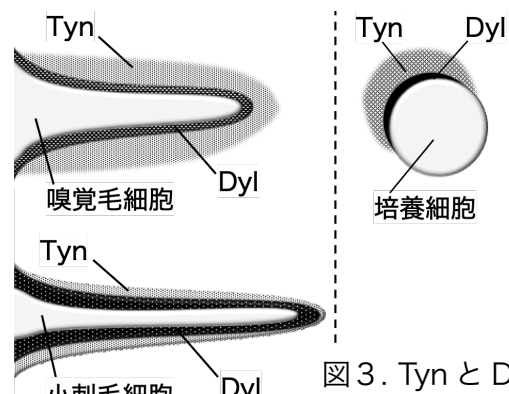


図3. TynとDylの局在パターン。

出されると考えられる。次に電子顕微鏡による観察を行うと、クチクラ形成初期のナノ薄膜ははしご状の構造であり、細胞膜から数十nm離れた位置に作られることがわかった(図4)。この位置はTynとDylの界面付近と予想された。

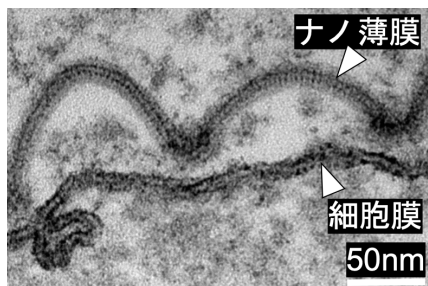


図4. 嗅覚毛のナノ薄膜。はしご状の微細構造が観察された。

これらの結果をもとに、以下の作業仮説をたてた。①TynとDylは分泌されると、相分離と各々の自己重合により二層のECM構造を作り、②その界面にTynとDylが構成するナノ薄膜が生じる。③Tynの厚い層は、ナノ薄膜の湾曲を引き起こす。④Dylはナノ薄膜の形成に必要である。この四つの仮説を実験的に検証するため、本研究では時空間的な局在パターンの観察や人為的な発現量操作を行い、Tyn, Dyl, ナノ薄膜の位置的・機能的

関係の解明に取り組んだ。また、得られる結果からナノ薄膜形成の数理モデルをたてる・

クチクラを人工的に再構成することで、ナノスケールの形態形成機構の理解を目指した。

### 3 研究成果

#### 3-1. Tyn, Dyl, ナノ薄膜の位置的關係

培養細胞において Tyn, Dyl を同時に発現すると、細胞外で分離した二層の ECM を形成する。このことから、Tyn と Dyl は同時に分泌されても相分離し、各々で自己重合する性質をもつ。しかし、本研究で生体内の Tyn, Dyl の時間的局在変化を観察したところ、Tyn の分泌は Dyl よりも二時間以上先行して起こった。このため、本研究の仮説①については一部異なり、生体内では相分離よりもむしろ順番に分泌され自己重合することで二層の ECM が作られると結論づけた。

次に、ナノ薄膜の位置を Tyn, Dyl の局在と比較するため、Tyn, Dyl を免疫染色法によって標識し電子顕微鏡で観察した。その結果、Dyl はナノ薄膜よりもやや内側に多く見られ、Tyn はナノ薄膜の外側に見られた。つまり、細胞膜上に Dyl, その外側にナノ薄膜、さらにその外側に Tyn の層が存在する、図 5 のような関係性があると示唆された。

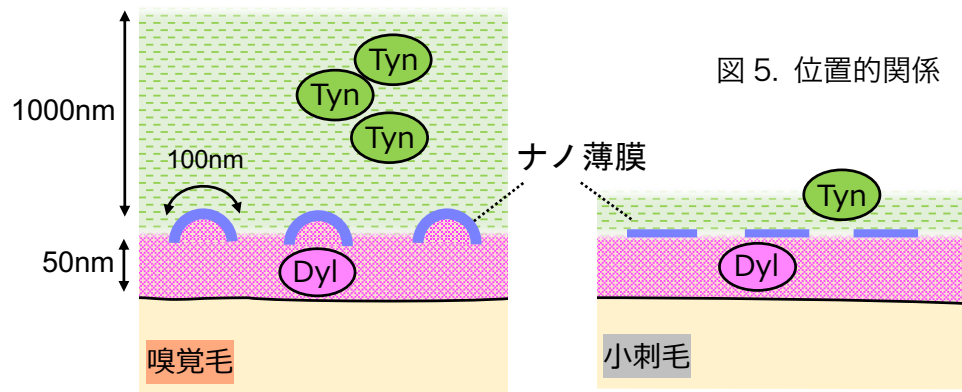
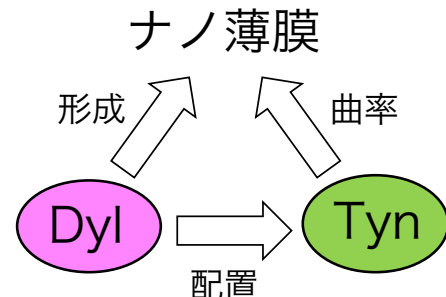


図 5. 位置的關係

#### 3-2. Tyn, Dyl, ナノ薄膜の機能的關係

Dyl の発現を抑制すると、嗅覚毛においてナノ薄膜が約半分まで減少したが、残ったナノ構造は正常であった。また、機械受容毛では Dyl はストライプ状のパターンを示すが、Dyl が本来発現すべき部位でのみナノ薄膜が作られず、他の部位には正常なナノ薄膜が見られた。よって Dyl はナノ薄膜の構成分子そのものではなく、局所的にナノ薄膜の形成を助ける役割を担うと考えられる。Dyl 発現抑制時の嗅覚毛クチクラの崩壊 (図 2 下段) は、このナノ薄膜の減少に起因すると考えられる。Dyl の過剰発現を行うと、嗅覚毛では細胞から離れた位置に Dyl が異所的に集積し、その周辺に異所的な Tyn の局在が見られた。機械受容毛では、おそらく周囲に Tyn の層がないため細胞膜上の Dyl が増えると共に、ナノ薄膜が異常に多く作られて多重化している様子が確認された。これらの観察結果から、Dyl はその量に応じてナノ薄膜の形成を促進する、Tyn を引きつけ周囲に配置するという 2 つの機能をもつと考えられる (図 6)。

図 6. 機能的關係



Tyn の発現を抑制すると、ナノ薄膜は形成されるが、曲率が減少した比較的なだらかな形状となった。これが Tyn 発現抑制時の微細孔消失 (図 2 中段) につながると考えられる。よって Tyn もまたナノ薄膜の構成分子ではなく、ナノ薄膜に曲率を与え波状のナノ薄膜パターンを生み出すと結論づけた (図 6)。

以上のことから、仮説③Tyn の厚い層は、ナノ薄膜の湾曲を引き起こす、④Dyl はナノ薄膜の形成に必要である、を支持する実験結果が得られた。一方、仮説②については一部異なり、ナノ薄膜は界面に生じるが、Tyn, Dyl が構成するのではない、という結果であった。より詳細にナノ薄膜の構造を観察すると、細胞膜の脂質二重層に構造・スケールが類似している (図 4)。このため、ナノ薄膜の構成成分は脂質である可能性がある。今後の課題として、Tyn または Dyl と親和性の高い成分を回収しリポドミクスを行い、ナノ薄膜の構成分子を同定したい。

### 3-3. Tyn の厚い層がナノ薄膜の湾曲を引き起こす機構の解明へ向けて

Tyn の発現抑制実験の結果から、嗅覚毛特異的な Tyn の厚い層がナノ薄膜の湾曲したパターンを作ることが示唆された。この機構の解明に向け、複数の仮説を立て検証を試みた。うち 1 つの仮説について、仮説を支持する予備的な実験結果が得られた。今後の課題として、これらの実験データを基にした数理モデルを構築し仮説を検証することで、ナノ薄膜が湾曲する機構を明らかにする。

### 3-4. ナノ薄膜の人工的再構成へ向けて

Tyn, Dyl を培養細胞で発現させ、電子顕微鏡により微細構造を観察したが、明らかなナノ薄膜様の構造は見られなかった。今後ナノ薄膜の構成分子が同定できれば、その分子の分泌促進を組み合わせ、ナノ薄膜を培養細胞に作らせる、つまり生体外で人工的に再構成することを試みる予定である。また、Tyn, Dyl と同じ ZP タンパク質四種類がナノ薄膜形成期の嗅覚毛で発現しており、それぞれ異なる局在を示すという結果を得た。これらの分子の共発現も試みる。

## 4 生活や産業への貢献および波及効果

昆虫のクチクラは、構造色や超撥水性、本研究の嗅覚毛クチクラのように特定の性質をもつ分子のみ通過させるフィルター機能など、様々な機能を果たす。また比較的シンプルな構造をしており、人工的再構成と、多方面での応用が期待できる。甲殻類由来のクチクラ成分は実際に創傷被覆材として使用されており、人間の体に使用することが可能であるが、この場合には生体で見られるような構造をもつわけではなく、付与できる機能は限られている。本研究では、昆虫クチクラ形成のごく初期、かつ最終形態を決定する重要な過程を一部明らかにした。これまでも電子顕微鏡で観察されてきたナノ薄膜だけでなく、その周辺に位置しこれまで着目されてこなかった ECM 層の存在を明らかにし、構成分子 Tyn, Dyl の機能を解明した。さらに研究を進めることで、デザインした構造・機能をもつ ECM 構造を作ることが可能になれば、多分野での貢献—再生医療分野では臓器の形成・再生を誘導する ECM の構築、医療分野・化粧品など産業分野では皮膚を保護する生物由来の薄膜の形成、材料工学分野では新規の機能をもち環境配慮・コスト削減に繋がる生分解可能な薄膜の作製—などが期待できる。