

(様式 5)

2023 年 3 月 22 日

学位（博士）論文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 2020 年度入学 学籍番号 20831007 氏名 村田 智志
主指導教員氏名	新垣 篤史
論文題目	ニホンカブトムシ上翅成熟過程におけるキチン積層構造と局在タンパク質の解析
論文要旨（2000 字程度） <p>本研究では、材料工学分野においてその有用性が示されている甲虫上翅のキチン積層構造形成機構の解明に向けて、ニホンカブトムシ <i>Trypoxylus dichotomus</i> の上翅の構造発達過程の解明及び機械的性質の評価、及び構造発達に關与するタンパク質の特定を目的とする。</p> <p>本研究は、以下の四章から構成されている。</p> <p>第一章「緒論」では、昆虫表皮のキチン積層構造及びそれらに由来する機械特性、さらに表皮形成機構に関する既往の知見についてまとめ、昆虫表皮の材料としての有用性及び表皮タンパク質と呼ばれる表皮に存在するタンパク質群が昆虫表皮の構造形成及び機械特性に關与する可能性を明らかにした。</p> <p>第二章では、<i>T. dichotomus</i> 上翅の微細構造制御機構の解明に向け、上翅の発達過程に着目して構造解析及び機械的性質の評価を行った。はじめに、完全に成熟した <i>T. dichotomus</i> 上翅のキチン積層構造及び機械的性質の解析を行った。機械的性質の試験の結果、<i>T. dichotomus</i> 上翅はより大きなひずみに耐えることができるようにしなやかさを有していることが示された。<i>T. dichotomus</i> におけるキチン積層構造の解析によって、90°のねじれ角で内原表皮が積層していることが確認された。また、上翅内原表皮において外原表皮と比較して強度が低いことが示された。このことから、内原表皮におけるキチン繊維配向及びタンパク質の架橋による硬化度が上翅の機械的性質を決定づけていることが示唆された。また、羽化後からの上翅成熟過程に伴った構造解析及び機械的性質の評価から、羽化時点ですでに形成されている上翅表層の外原表皮は羽化後 18 時間以内で完全に硬化が完了することが示された。さらに、成熟した上翅において観察される表層・裏層からなる上翅の二層構造が、羽化直後から段階的に発達していくことが示された。</p> <p>第三章では、<i>T. dichotomus</i> 上翅に存在する表皮タンパク質を網羅的に解析し、比較することで、上翅形成過程において機械特性の向上及びキチン積層構造の制御に關与する表皮タンパク質群を明らかにすることを目的とした。羽化直後の白く柔らかい未硬化上翅と、</p>	

羽化後 8 日間が経過し黒く硬化した成熟上翅との間で比較プロテオーム解析を行った。その結果、未成熟上翅からは 227 種類、成熟上翅からは 325 種類のタンパク質が分離された。それらのうち、31 種類が表皮タンパク質であり、未硬化上翅では 25 種類、成熟上翅では 16 種類が存在し、10 種類が両段階の上翅で重複していた。上翅から分離された表皮タンパク質のうち、最も多い 27 種類の CPR ファミリーに属した表皮タンパク質のマルチプルアライメント解析を行った。CPR ファミリーは、配列中に RR モチーフを有することを特徴とする。その結果、Gly を豊富に含むことを特徴とし、羽化直後の未成熟上翅からのみ分離された表皮タンパク質群 (cluster 1) と、成熟・未成熟両段階の上翅から共通して抽出及び分離された、Ala-Ala-Pro の反復配列を配列中に多数含むことを特徴とする表皮タンパク質群 (cluster 2) の 2 つの表皮タンパク質群の存在が示された。さらに、これらのタンパク質の qPCR による遺伝子発現解析の結果、cluster 1 及び cluster 2 に含まれる表皮タンパク質群はそれぞれ蛹化後 10 日間及び 12 日間が経過した蛹に存在する上翅で最も高発現となることが示された。Gly に富む cluster 1 に属した表皮タンパク質群は、外原表皮が形成される時期に高発現となり、成熟上翅からは分離されなかったことから、外原表皮のキチン繊維と架橋を形成し硬化を促進する機能を有することが考えられた。また、Ala-Ala-Pro の反復配列を有する cluster 2 に属した表皮タンパク質群は、成熟上翅においても抽出可能であったことから、比較的硬化度の低い内原表皮に局在していることが考えられ、上翅形成過程において内原表皮のキチン積層構造形成に関与している可能性が示唆された。本研究により、上翅に局在する表皮タンパク質の新たな配列的特徴が明らかとなり、配列的特徴及び発現パターン、さらに上翅形成過程における機能によって 2 つのグループが存在することを示した。

第四章では、本研究において得られた結果及び知見をまとめ、その成果と意義を明らかにした。本研究では、上翅の構造発達過程の観察及び硬化前後の上翅の比較プロテオーム解析により、上翅に局在する表皮タンパク質を網羅的に解析し、機能を考察したことで、上翅の高い機械特性を生み出すキチン積層構造発達に関与する表皮タンパク質群を特定し、そのアミノ酸配列の特徴を明らかにした。今後、これらの表皮タンパク質群の機能解明を行うことで、上翅におけるキチン積層構造形成機構の解明に繋がる。さらに、本研究で示した甲虫タンパク質群を利用しキチン材料の構造制御手法を確立することで、キチンを利用した高付加価値な新材料の開発が期待される。

(英訳)

Beetles possess a set of highly modified and tanned forewing, elytron, which is lightweight yet rigid and tough. Immediately after eclosion, the elytra are initially thin, pale and soft. However, they rapidly expand and subsequently become hardened and often dark, resulting from both pigmentation and sclerotization. Elytra are consisting of chitin fibers and proteins, and their mechanical properties are highly affected by its chitinous microstructure. In this study, we analyzed changes in protein composition during the developmental processes of the elytra in the Japanese rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus*, to clarify the formation mechanisms of elytra. Scanning electron microscopic (SEM) observation and mechanical tests revealed the feature of chitin laminar structure and mechanical properties of matured *T. dichotomus*' elytra. Moreover, we focused on elytral maturation process to clarify the process of structural development and sclerotization in elytra. A series of SEM observation and computed tomography revealed the developmental process of an elytron of *T. dichotomus* after eclosion. A fully matured elytron has two chitinous layers, which are elytral dorsal cuticle (EDC) and elytral ventral cuticle (EVC). However, immediately after eclosion, an elytron appeared as a single layer and each layer had exocuticle only. According to our observation, the elytron was expanded by extension of trabeculae accompany with the deposition of endocuticle. Moreover, we performed comparative proteomics for the untanned and tanned elytra of *T. dichotomus*. Using mass spectrometry, a total of 414 proteins were identified from both untanned and tanned elytra, including 31 cuticular proteins (CPs), which constitute one of the major components of insect cuticles. Moreover, CPs containing Rebers and Riddiford motifs (CPR), the most abundant CP family, were separated into two groups based on their expression and amino acid sequences, such as a Gly-rich sequence region and Ala-Ala-Pro repeats. These protein groups may play crucial roles in elytra formation at different time points, likely including self-assembly of chitin nanofibers that control elytral macro and microstructures and dictate changes in other properties (i.e., mechanical property). Clarification of the protein functions will enhance the understanding of elytra formation and potentially benefit the development of lightweight materials for industrial and biomedical applications.