ワモンゴキブリの肢の再生における体液性レクチンの役割

東京大学薬学部微生物薬品化学教室 久保健雄, 川崎清史, 名取俊二

Three lectins named *Periplaneta* lectin, regenectin and 26kDa lectin were purified from the hemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*. These lectins shared several common features : antigenicity, Ca^{2+} -dependency, subunit structure, and molecular shape, showing that they are members of a structural family. The participation of these lectins in leg regeneration was investigated by immunoblotting and immunofluorescence studies. Regenectin was found to appear transiently around developing muscle cells in the late stage of leg regeneration whereas 26kDa lectin was found outside the epidermis cells in the middle stage, suggesting that they play different roles in leg regeneration.

regeneration/cockroach/lectin/regenectin/*Periplaneta*

1. はじめに

動物の器官や組織の再生は程度の差はあるが、種を超えて観察される。再生能は動物が器官や組織を失った際に形態と機能を回復するための基本的な生体防御反応であり、再生を制御する分子機構の解析は今日に至るまで生物学の重要な課題の一つとなっている。

ワモンゴキブリ *Periplaneta americana* などの昆虫では肢や触角、複眼などの器官の再生能が極めて高い。特に肢の再生は若虫が一回脱皮する期間に完了するので、以前からこの昆虫を用いて再生における位置情報の解析や、内分泌系や神経系と再生との関連について形態学的、生理学的なレベルでの研究が進展してきた。ところが、こうした昆虫の器官の再生に関与する分子の解析がなされた例は現在まで皆無と言ってよい状況である。

一方、昆虫などの無脊椎動物の体液中にはレクチンが存在し、その幾つかは抗体産生能を持たない昆虫にあって異物排除や感染防御に働く生体防御タンパク質と考えられている^{1), 2)}。私たちは、レクチンが糖鎖を介して細胞に結合し、細胞間コミュニケーションを司

るタンパク質であることから、再生においてもこうした体液性レクチンが細胞間相互作用に働く可能性を考え、ワモンゴキブリを材料にレクチンの再生における役割を解析してきた。

その結果、表1にまとめたように、ワモンゴキブリの体液には構造や性質が類似した複数のレクチンが存在し、この内の2種類のレクチンが肢の再生の異なるステージに再生芽に出現し、異なる組織に局在することが分ってきた。このことは、昆虫体液性レクチンが役割分担することにより、再生芽の形態形成に働くことを示唆している。本項ではワモンゴキブリ体液から精製したこれらの3種のレクチン *Periplaneta* lectin³⁾, regenectin^{4), 5)}, 26kDa lectin⁶⁾の性質と再生芽での局在性についての知見を紹介し、再生におけるレクチンの機能について考察したい。

2. *Periplaneta* lectin の精製とその特徴的な高次構造³⁾

ワモンゴキブリの体液性レクチンの肢の再生への関与を調べるに当たって、我々はまずワモンゴキブリの成虫体液中に存在するレクチンの精製を行った。羊赤血球凝集活性を指標に精製を進めたところ、約400匹の成虫体液から30 μg のレクチンを精製することができた³⁾。精製したレクチン *Periplaneta* lectin はサブユニットの分子量が30kDaで活性に Ca^{2+} を要求するいわゆるCタイプレクチンであった。このレクチンは羊赤血球やヒトA型赤血球を凝集し、N-アセチルガ

The role of humoral lectins of American cockroach on leg regeneration

Takeo KUBO, Kiyoshi KAWASAKI and Shunji NATORI

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

表1 ワモンゴキブリ体液性レクチンの性質

	<i>Periplaneta</i> lectin ³⁾	regenectin ^{4), 5)}	26kDa lectin ⁶⁾
サブユニットの分子量	30kDa	37kDa	26kDa
非変性条件下の分子量	1,500kDa	2,000kDa	2,600kDa
高次構造 (電子顕微鏡像)	棒状	棒状	棒状
共通抗原性	+	+	+
Ca ²⁺ 依存性	+	+	+
糖特異性	N-アセチルガラクトサミン, D-フコース	スクロース	ラムノース
血球特異性	ヒツジ, ウサギ, ヒト A 型赤血球	ウサギ赤血球	ウサギ赤血球
肢の再生芽での出現時期	検出されない	再生中期から後期	再生中期
肢の再生芽での局在性	検出されない	幼若な再生筋細胞の周囲	再生上皮細胞の外側

ラクトサミンと D-フコースが認識糖である。

このレクチンは分子量が約1,500kDaであり、サブユニットが約50個会合してできた巨大なホモポリマーであることが分った。*Periplaneta* lectin の電子顕微鏡像を図1Aに示すが、平均の長さが50.5nmで棒状の螺旋状の分子像が観察できる³⁾。こういった高次構造を持つレクチンは他に報告されていないが、我々が同じワモンゴキブリの成虫体液から精製した他のレクチン regenectin, 26kDa lectin についてはこの分子像と酷似した分子像が観察されており (図1B, C)⁶⁾、これらのワモンゴキブリの体液性レクチンが構造上のファミリーを構成していることが示唆される。

3. 肢の再生芽に局在する 体液性レクチン regenectin⁴⁾

次に私たちは、このレクチンが肢の再生芽に局在するかどうか調べる目的で、*Periplaneta* lectin に対する抗体を調製し、肢の再生芽のイムノブロット解析を行った。その結果、肢の再生芽には *Periplaneta* lectin そのものは検出できなかったが、*Periplaneta* lectin と共通抗原性を示す分子量37kDaのタンパク質が、肢を切断してから17～26日目の再生芽に特異的に出現し、脱皮した後の再生肢では消失することが分った (図2)⁴⁾。この37kDaタンパク質は *Periplaneta* lectin 同様、ワモンゴキブリの体液中にも存在する。この結果から私たちは、この37kDaタンパク質が *Periplaneta* lectin と共通抗原性を示す新しい体液性レクチンであり、再生後期に再生芽の形態形成に働くのではないかと考えた。

このことを確かめるために、共通抗原性を指標にして成虫体液からこの37kDaタンパク質の精製を試みた

図1. 精製した *Periplaneta* lectin, regenectin, 26kDa lectin の電子顕微鏡像
精製した *Periplaneta* lectin (A), regenectin (B), 26kDa lectin (C) を 3% ウラニル酢酸によりネガティブ染色して電子顕微鏡で観察した。バーの長さは100nmを示す。

図2. *Periplaneta* lectin に対する抗体を用いたワモンゴキブリの肢の再生芽のイムノブロット解析
肢を切断後、経時的に肢の再生芽(+)と、対照として同じ個体の未処理の肢(-)を採取し、ホモジネートを調整し、*Periplaneta* lectin の抗体を用いてイムノブロット解析を行った。2次抗体は、 125 I 標識したものを、オートラジオグラフィーにより抗原を検出した。数字は手術後の日数で、この場合約30日後に脱皮して再生肢が出現する。26日以前は再生芽について、33日以降は脱皮した昆虫の再生肢について調べている。右端のレーンには精製した *Periplaneta* lectin を10ng、他は各レーン50 μ g のタンパク質を泳動した。矢印は、*Periplaneta* lectin の30kDa のサブユニットとこれと共通抗原性を示す37kDa タンパク質 (regenectin) を示している。手術後17-26日目の再生芽と体液 (Hemolymph) 中に37kDa タンパク質が検出されている。

ところ、このタンパク質はスクロースを共有結合させたセファロースによるアフィニティークロマトグラフィーで簡単に精製できることが分かった。精製した37kDa タンパク質の分画にレクチン活性が検出されたので、この37kDa タンパク質のレクチンとしての性質を詳細に解析したところ、このタンパク質もまた分子量が2,000kDa のCタイプレクチンであり、*Periplaneta* lectin とは異なり羊赤血球は凝集せず兎赤血球を凝集し、スクロースが最も強い阻害糖であることが分かった⁴⁾。

この37kDa レクチンは、再生芽で初めて検出されたレクチンであることから、私たちはこのレクチンを「再生レクチン」の意味で regenectin と命名している。恐らくこのレクチンは肢の再生後期に一過的に発現することにより再生組織の細胞接着因子として機能するものと思われる。

4. 発生過程における regenectin の解析⁵⁾

次に、regenectin の再生での機能を推測するために、regenectin が(1)再生を伴わない傷の修復過程でも発現するかどうか(2)正常な肢の発生過程でも発現するかどうか調べる目的で regenectin に対する抗体を用いたイムノブロット解析を行った。

ワモンゴキブリは不完全変態昆虫であり、若虫の肢

を切断した場合には、残った肢の中で再生が進行し、次の脱皮の際に再生肢が出現する。ところが、成虫の肢を切断すると、傷の治療は起きるが脱皮しないため肢の再生は起こらない。従って、成虫の肢を切断した際の regenectin の含量を調べることにより regenectin が再生に働くのか、傷の修復に働くのか区別することができる。結果は、成虫の肢を切断した場合には若虫の肢の再生芽に比べて regenectin の含量は非常に低いことがわかった⁵⁾。従って、regenectin は傷の治療ではなく、再生に伴う組織の構築に主に働くものと思われる。

さて、一般に再生は発生と同等の現象であり、人工的に発生を制御できる優れたシステムであると考えられる。ところが、発生における形態形成が身体全体で同時に進行するのに対して、再生は全体の発生が終了した状況で一部の組織のみ形態形成のプログラムを繰り返す点で、発生とは異なる。従って、再生と発生が一部異なる分子を利用して進行する可能性もある。そこで私たちは、regenectin が正常な発生過程でも発現するかどうか調べてみた。その結果、regenectin は胚の時期には殆ど検出されることがわかった。また、若虫の発育段階を通じて正常な肢にも殆ど検出されなかった⁵⁾。このことは regenectin が正常な肢の発生には関与しないことを示唆している。

後で述べるが, regnectin は再生芽の筋細胞の周囲に特異的に局在する。恐らく regnectin は再生筋細胞に特異的な接着分子として働くものと予想される。regnectin が発生過程に発現しないことは、このタンパク質が再生する筋細胞を再生が終了するまで分化し

た筋細胞と隔離するために働くことを予想させる。

5. regnectin の再生芽での局在性の解析⁵⁾

次に私たちは、再生芽における regnectin の役割を解析するため、regnectin に対する抗体を用いた蛍光

図3. 再生筋細胞の分化に伴う regnectin の局在性の解析

パネル A, B, C は再生中期の筋芽細胞, パネル D, E, F は再生中期の筋管細胞, パネル G, H, I は再生後期の筋細胞, パネル J, K, L は正常な肢の筋細胞について抗 regnectin 抗体を用いた蛍光抗体法の結果である。左のパネルは抗 regnectin 抗体, 中央のパネルは正常 IgG を用いた場合で、右のパネルは左の標本をトルイジン青で染色したものである。図中のバーは0.11mm を示す。

抗体法により再生芽での局在性を解析した。ワモンゴキブリの若虫の肢を切断すると残された肢の中で筋組織が部分的に退縮し、その空間に上皮性細胞で囲まれた再生芽が形成される（図4参照）。次に再生芽の中で筋細胞が分化し、脱皮直前には再生肢の周りに新しいクチクラが分泌される。

蛍光抗体法の結果、regenelectin は再生後期に再生筋細胞の周囲に特異的に局在することが分った⁵⁾。従って、regenelectin は再生後期に再生筋細胞の形成に関与するものと考えられる。筋細胞の分化段階に伴う regenelectin の局在性の変化を調べた蛍光抗体法の結果では、図3に示すように筋芽細胞から筋管細胞、筋細胞と再生筋細胞の分化が進むにつれて regenelectin が細胞の周囲に局在してゆく様子がわかる⁵⁾。一方、正常な筋細胞では regenelectin の蛍光は殆ど観測されない。以上の事実は、regenelectin が再生芽の再生筋細胞に特異的な接着分子として機能することを示唆している。

6. 再生芽の上皮性細胞の外側に局在する26kDa lectin⁶⁾

さて、同じワモンゴキブリの成虫体液から、再生芽の上皮細胞の周囲に局在するレクチン 26kDa lectin が見いだされた。このレクチンもまた、regenelectin と同様 *Periplaneta* lectin と共通抗原性を示すタンパク質として、成虫体液から精製、同定したものである。

先に述べたようにスクロース-セファロースカラムに体液を添加してスクロースで溶出すると、regenelectin が精製できる。このカラムから引き続き EDTA

を含むバッファーで溶出した分画について、*Periplaneta* lectin に対する抗体を用いてイムノブロット解析を行うと、*Periplaneta* lectin と共通抗原性を示す分子量26kDa のタンパク質が新たに検出された⁶⁾。このタンパク質についても regenelectin 同様、再生芽の形態形成に関与するレクチンである可能性がある。そこで、*Periplaneta* lectin との共通抗原性を指標にこの26kDa タンパク質の精製を進めたところ、ラムノースによって最も強く阻害される新しいCタイプレクチンであることが判明した⁶⁾。

精製した26kDa lectin に対して抗体を調製し、再生芽でのイムノブロット解析を行ったところ、regenelectin とは異なり再生中期に再生芽で増加することが分った⁶⁾。さらに、26kDa lectin に対する抗体を用いた蛍光抗体法の結果では、このレクチンは再生芽を取り囲む上皮性細胞の外側に観察された。恐らくこのレクチンは再生上皮細胞の形成過程に関与するのであろう。図4にこれらの2種類のレクチンの再生芽での局在性についてまとめてある。これらのレクチンの発現が一過的で、組織特異的であることを考えると、昆虫の肢の再生においては、これらのレクチンが役割分担することにより再生芽の細胞の空間的な秩序の形成に働くことが予想される。

7. ワモンゴキブリの体液性レクチンの一次構造の比較⁷⁾

これらの体液性レクチンは、アミノ酸配列のレベルでも実際、非常によく似ていることが分った。同じワ

図4. ワモンゴキブリの肢の再生芽における体液性レクチンの局在性
ワモンゴキブリの肢を矢印の部分で切断すると、残された肢の内部で矢印の順に再生が進行する。26kDa lectin は中央のパネルに示すように、再生中期に再生芽を取り囲む上皮性細胞の外側に局在し（点で示した部分）、regenelectin は再生後期に再生芽の内部の幼若な筋細胞の周囲に局在する（黒く塗った部分）。

図5. LPS結合タンパク質と regnecin, 26kDa lectin のアミノ酸配列の比較

(1) cDNA から予想される LPS 結合タンパク質のアミノ酸配列の一部 (2) リジルエンドペプチダーゼ消化して得た regnecin のペプチド断片の部分アミノ酸配列 (3) 同様にして得た 26kDa lectin の部分アミノ酸配列を示す。数字は LPS 結合タンパク質のアミノ酸配列の N 末端からの番号。regnecin のアミノ酸配列はアミノ酸が 18 個 (最後は 18 番目のリジン) と 14 個の 2 種のペプチド断片をつないで記載してある。同じアミノ酸配列は括弧で囲んでいる。

モンゴキブリの体液から私たちは、既到大腸菌の LPS (lipopolysaccharide) 結合タンパク質を精製しているが、このタンパク質もやはり C タイプレクチンの一種であり、LPS の糖鎖の部分認識する¹²⁾。この LPS 結合タンパク質については cDNA が単離できており、全一次構造が推定されている。また、このタンパク質は、mRNA の発現量が、大腸菌をワモンゴキブリに注入した際に増加することから、この昆虫の生体防御物質であると考えられている⁶⁾。Regnecin, 26kDa lectin について部分アミノ酸配列を決定したところ、図5に示すように、この LPS 結合タンパク質のアミノ酸配列と非常によく似た配列を持つことが分かった⁷⁾。C タイプレクチンは、一般に種を超えて保存されているドメインを分子内に持つことが知られているが、これらのレクチンのアミノ酸配列の類似性はこのドメイン以外の部分に見いだされている。このことは、ワモンゴキブリの体液性レクチンが構造上のファミリーを構成していることを示唆している。

8. まとめと今後の展望

これまでの研究で、ワモンゴキブリの肢の再生において同じファミリーに属する 2 種類のレクチン regnecin, 26kDa lectin が時期特異的、組織特異的な局在を示すことが明らかになった。これらのレクチンは再生芽で再生している筋細胞や上皮細胞の接着や選別に関与することが示唆される。恐らく再生芽では、これらのレクチンに対する特異的なレセプターが発現することにより、再生芽でのレクチンの局在が誘起されるのであろう。また、これらのレクチンが正常な形態形

成過程には見いだされないことから、再生と発生では異なる分子が利用されている可能性が指摘できる。本研究はこれまで未開であった昆虫の肢の再生を分子レベルで解析した初めての例であるとともに、レクチンの局在を手がかりに再生における細胞間認識に焦点を当てた最初の例でもある。

本項で述べた昆虫のレクチンの再生での役割については幾つかの課題が残っている。まずこれらのレクチンが再生において実際に機能することを示すことが必要である。また、再生能を持たない成虫体液からこれらのレクチンが精製されていることは、レクチンが再生に関与するとの立場からは、一見矛盾しているとも思われる。しかしながら、同じファミリーに属する LPS 結合タンパク質が生体防御に働くことを考えると、これらのワモンゴキブリ体液性レクチンはどれも若虫の再生に関与する一方で、体液中のレクチンは生体防御に働く、二面性を持つのかも知れない。

また、ワモンゴキブリは肢ばかりでなく触角や複眼などの器官も再生能を持つ。従って、これらの組織(神経細胞)の再生芽についても組織特異的なレクチン(例えば *Periplaneta* lectin)が存在する可能性がある。さらに、他の動物の再生においてもこうしたレクチンの関与があるのかどうかも興味深い問題である。これについては現在、これらのレクチンの cDNA クローニングが進行中であり、今後 cDNA を用いた研究により、こうした方面へのアプローチも可能になると思われる。

文 献

- 1) Komano, H., Natori, S. (1985) *Dev. Comp. Immunol.*, **9**, 31-40.
- 2) Jomori, T., Kubo, T., Natori, S. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **190**, 201-206.
- 3) Kubo, T., Natori, S. (1987) *Eur. J. Biochem.*, **168**, 75-82.
- 4) Kubo, T., Kawasaki, K., Natori, S. (1990) *Insect Biochem.*, **20**, 585-591.
- 5) Kubo, T., Kawasaki, K., Y. Nonomura, Natori, S. (1991) *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 83-90.
- 6) Kubo, T., Kawasaki, K., Natori, S. in preparation.
- 7) Kawasaki, K., Kubo, T., Natori, S. unpublished data.
- 8) Jomori, T., Natori, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13318-13323.

くぼ たけお

昭和35年愛媛県に生る。57年東京大学薬学部卒業。61年東京大学大学院薬学系研究科博士課程中退、東京大学薬学部（微生物薬品化学教室）助手となり現在に至る。

研究テーマ：昆虫の再生の生化学。再生には生化学では解決できない問題もありそうで、生物物理の分野にも興味を持っています。

連絡先：東京都文京区本郷3-7-1

東京大学薬学部微生物薬品化学教室

☎03-3812-2111 内線4825

かわさき きよし

昭和40年生まれ。平成元年東京大学薬学部卒業。現在東京大学大学院博士課程1年。『再生をはじめ、生物の形態形成全般に興味をもっています。将来的には応用という立場にたって生命科学をやりたいと考えています。』趣味はスポーツ全般、ドライブ。

なとり しゅんじ

昭和13年山梨県に生る。38年東京大学薬学部卒業。43年東京大学大学院博士課程終了。43～46年米国コネティカット州、イェール大学へ留学。A. Garen 教授の下でショウジョウバエの遺伝学の研究に従事した。47年東京大学薬学部助手。51年同助教授。55年より教授。

研究テーマ：真核細胞の転写制御機構、昆虫の発生と生体防御機構について研究を行っている。

連絡先：東京都文京区本郷3-7-1 東京大学薬学部微生物薬品化学教室

☎03-3812-2111