Insect Lectins and Epimorphosis

昆虫レクチンと真再生

Kubo, T.; Arai, T.; Kawasaki, K.; and Natori, S.

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

FAX: 81-3-5684-2973, E-mail: fkubo@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp

Key Words: cockroach, hemolymph lectins, insect, regeneration, self-defense**Abstract**

Organ regeneration (epimorphosis) differs from development in that morphogenesis occurs in a restricted region neighboring normal tissues. However, the molecular mechanisms specific to epimorphosis are unknown. Previously, we reported that regenectin, a humoral lectin from the American cockroach *Periplaneta americana*, appears transiently during leg regeneration and is localized around regenerating muscle cells [Kubo, T. *et al.* (1991) *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 83–90]. We recently isolated a cDNA for regenectin and examined the expression of the gene. We found that the gene was activated in the epidermis of the regenerating leg but not during the normal developmental stages. These results suggest that regenectin is specifically synthesized and secreted by the regenerating epidermis and that it plays a role in the formation of muscle in a paracrine manner.

Analysis of the primary structure of regenectin revealed that regenectin belongs to the same family as LPS-binding protein, which was purified previously from *Periplaneta* hemolymph and which participates in the defense system. This implies that epimorphosis and the defense system share some common molecular aspects. In this minireview, we describe recent research on cockroach humoral lectins and discuss molecular mechanisms specific to epimorphosis.

A. Introduction

The ability to regenerate a lost body part is widely observed among various multicellular organisms although its extent varies from physiological regeneration like molting of bird's feathers or replacement of intestinal epidermis to injury-induced regeneration of a body part that was lost accidentally. Particular cases of injury-induced regeneration where not only wound healing but also restoration of the lost structure occur are called epimorphosis. Epimorphosis shares some common features with development and tends to be considered as a simple model for development. However, epimorphosis differs from development in that morphogenesis occurs in a restricted region neighboring normal tissues. The molecular mechanisms intrinsic to epimorphosis are unknown, although molecular de-

要 約

器官再生 (真再生) は、正常な組織に隣接した限られた領域で形態形成が起こる点で、発生とは異なる現象である。しかしながら、こうした真再生に固有な分子機構は不明である。我々はこれまでに、ワモンゴキブリの体液性レクチンであるリジェネクチンが、この昆虫の肢の再生過程に一過的に出現し、筋細胞の周囲に局在することを報告した [Kubo, T. *et al.* (1991) *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 83–90]。今回、リジェネクチンの cDNA を単離して、遺伝子発現を解析した結果、リジェネクチン遺伝子は再生芽の上皮組織で発現すること、正常な発生過程には発現しないことを見出した。従ってリジェネクチンは、再生上皮組織で特異的に合成、分泌されて筋組織の形成に働くパラクライン因子である可能性がある。

一方、一次構造の比較から、リジェネクチンは同じ体液から精製され、感染防御に働くことが示されている LPS-結合タンパク質と同じファミリーに属することが明らかになった。また、同じファミリーに属する *Periplaneta* レクチンが、LPS-結合タンパク質同様、感染防御に働くことが示された。このことは、真再生と感染防御が、共通の分子の側面を持つことを意味する。本稿では、こうしたワモンゴキブリの体液性レクチンに関する最近の知見を紹介し、真再生に特有な形態形成の分子機構について議論する。

A. はじめに

個体の一部分が失われた際にその構造を回復する再生能は、鳥類の羽毛の抜け替わりや腸管の上皮細胞の置換のような生理的な再生から、偶発的原因によって失われた部分が修復される外傷的再生まで、程度の差はあるものの多くの多細胞生物に観察される。外傷的再生の中でも、再生の程度が傷口の治癒にとどまらず失われた形態が回復される場合を、真再生または付加再生 (epimorphosis) と呼ぶ。こうした真再生は、発生と多くの共通項を持ち、発生の簡便な研究材料と考えられがちである。しかしながら、再生は、既にできあがった組織に隣接した限られた領域で形態形成が起こる点で、発生とは異なる現象である。分子発生生物学が全盛期を迎えた今日においても、こ

Fig.1. Localization of regenectin and expression of the gene for regenectin in the regenerating leg of the American cockroach. After amputation, the muscle cells partly retracted. Epidermis cells lined up in the shape of the folded leg in the middle stage of regeneration. In the late stage, myoblasts that appeared in the regenerating leg differentiated into muscle cells. The gene for regenectin was activated in the epidermis in the middle stage, and regenectin was localized around the myoblasts and immature muscle cells as indicated by the shadows.

velopmental biology is in its golden age at present.

We analyzed the molecular mechanisms of organ regeneration (epimorphosis) using the American cockroach (*Periplaneta americana*) as an experimental model. Cockroaches have a strong ability to regenerate organs including legs, antennae and compound eyes, and are suitable for studying epimorphosis. When a leg of *Periplaneta* is cut off at the tip of the coxa, muscle tissue starts to retract in part of the remaining coxa and the outline of the folded regenerating leg is formed by epidermal cells during the middle stage of regeneration. In the late stage, myoblasts that have appeared in the regenerating leg differentiate into muscle cells, and the epidermis secretes a new cuticle to complete the regenerative process (Fig. 1) (1, 2). So far, we have purified four C-type lectins that have similar molecular characteristics from the hemolymph of this insect (Table I) (3–6). They are huge aggregates of a single subunit,

した再生の分子機構の本質的な理解はなされていない。

我々はワモンゴキブリを材料として、器官再生(真再生)の分子メカニズムの解析を進めてきた。ゴキブリ目の昆虫は、肢や触角、複眼などの器官の再生能が高く、再生の研究材料として優れている。ワモンゴキブリの若虫の肢を基節を残して切断すると、残された肢の内部で筋組織が一部退縮し、再生中期には、上皮組織で囲まれた再生肢の輪郭が形成される。再生後期には、再生芽の内部に出現した筋芽細胞が筋細胞へと分化するとともに、上皮組織がクチクラを分泌して再生肢の形成が終了する(図1)(1, 2)。我々はこれまでに、この昆虫の体液中から性質が類似した4つのC-タイプレクチンを精製し(3–6)、このうち、リジェネクチンおよび26-kDaレクチンと命名したレクチンが、肢の再生過程に一過的に発現することを見出した(表I)。これらのレクチンは、いずれも単一なサブユニットが会合して

Table I. Summary of lectins purified from *Periplaneta* hemolymph.

	Subunit M. M.	Intact M. M.	Ca ²⁺ - dependency	Sugar specificity	Possible functions
Regenectin	37 kDa	2,000 kDa	Yes	Sucrose	Expressed in the regenerating legs; localized around immature muscle cells.
26-kDa lectin	26 kDa	2,600 kDa	Yes	Rhamnose	Localized around the epidermis in regenerating legs.
LPS-binding protein	30 kDa	450 kDa	Yes	<i>E. coli</i> LPS	Induced in the hemolymph on bacterial infection. Functions as an opsonin.
<i>Periplaneta</i> lectin	30 kDa	1,500 kDa	Yes	GalNAc, KDO	Functions as an opsonin.

Abbreviations: M. M., molecular mass; KDO, 2-keto-3-deoxy octonate.

and require Ca^{2+} for the activity. Among them, regenectin and the 26-kDa lectin are expressed transiently during leg regeneration; the 26-kDa lectin is localized around the epidermis in the middle stage of regeneration (6), whereas regenectin is localized around the immature muscle cells in the late stage (4, 7). These results suggest that insect humoral lectins act as cell type-specific cementing substances in leg regeneration (for review, see 8, 9).

Recently, we isolated a cDNA for regenectin and found that mRNA for regenectin is expressed selectively in the epidermis of the regenerating leg in the middle stage of regeneration but not in the normal developmental stages or in growing nymphal legs (Arai, T. *et al.*, manuscript in preparation). Thus, regenectin may be secreted from the epidermis to play a paracrine role in muscle formation during leg regeneration.

Analysis of the primary structure of regenectin revealed that it belongs to the same family as LPS-binding protein, a lectin that we previously purified from *Periplaneta* hemolymph and for which the cDNA has already been isolated. We reported that the LPS-binding protein binds specifically to the LPS of *Escherichia coli* (5) and that the gene for the protein is expressed transiently in the fat body when the insect is infected with bacteria (10). The LPS-binding protein acts as an opsonin to prompt phagocytosis of bacteria by hemocytes, suggesting that it is a defense protein of the insect (11). Recently, *Periplaneta* lectin, another lectin that belong to the same family, was also shown to function as an opsonin (12).

These results suggest that cockroach humoral lectins evolved from the same ancestral gene and specialized to function in epimorphosis and defense, and this implies that epimorphosis shares some common molecular aspects with the defense system. In this minireview, we describe recent advances in insect lectin research and discuss the molecular mechanisms intrinsic to epimorphosis.

B. Molecular Cloning of cDNA for Regenectin and Gene Expression in the Regenerating Leg

Regenectin is expressed transiently around immature muscle cells in the regenerating leg, and disappears when regeneration is complete (4, 7). Regenectin is normally present in the hemolymph, so the regenectin detected in the regenerating limb may be either derived from the hemolymph, or synthesized *de novo* in the regenerating leg. Analysis of the mechanism of expression of regenectin seems to be important to our understanding of the molecular basis of epimorphosis. Therefore, we tried to isolate its cDNA and examine whether the gene for regenectin is expressed in regenerating legs.

Analysis of the cDNA for regenectin revealed that the protein is composed of 238 amino acid residues and has a signal sequence common to secretory proteins at its N-terminal end and a possible N-linked glycosylation site. A carbohydrate rec-

できた巨大な分子で、活性に Ca^{2+} を要求する。また、26-kDa レクチンが再生中期に上皮組織の周囲に局在するのに対し (6)、リジェネクチンは再生後期に筋細胞の周囲に一過的に局在することがわかった (4, 7)。従って、昆虫の肢の再生においては体液性レクチンが、組織特異的な接着分子として機能すると考えられる。この点については、幾つかの総説を発表しているのでご参照頂きたい (8, 9)。

最近我々は、リジェネクチンの cDNA クローニングを行い、遺伝子発現を解析した結果、その mRNA は肢の再生中期から後期にかけて、再生芽の上皮組織で発現しており、正常な発生段階には発現しないことを見出した (Arai, T. *et al.*, manuscript in preparation)。従ってリジェネクチンは、再生芽の上皮組織で産生されて筋組織の形成に働く、再生過程に特異的なパラクライン因子である可能性が考えられる。

また一次構造の比較から、リジェネクチンは、やはりこの昆虫の体液中から精製され、cDNA が単離されている LPS-結合タンパク質と同じレクチンファミリーに属することが示された。LPS-結合タンパク質については、大腸菌のリポ多糖 (LPS) に結合し (5)、細菌感染時に脂肪体で遺伝子が緊急応答的に発現すること (10)、体液細胞 (哺乳類のマクロファージに相当する) が大腸菌を捕食する際に、オプソニンとして作用することが分かっており (11)、この昆虫の生体防御タンパク質と考えられている。また今回、同じファミリーの *Periplaneta* レクチンについても、サルモネラ菌の LPS に結合し、オプソニンとして機能することを新たに見出した (12)。

こうした知見は、ワモンギブリの体液性レクチンが共通の祖先型遺伝子を持ち、器官再生と感染防御に役割分担したことを示唆しており、器官再生が異物排除機構と共通の分子の側面を有することを意味する。本稿では、こうした昆虫レクチンに関する最近の知見を紹介し、真再生に固有な分子機構を考察したい。

B. リジェネクチンの cDNA クローニングと再生芽での遺伝子発現

リジェネクチン分子は肢の再生後期に筋細胞の周囲に一過的に検出され、新しい再生肢が出現すると消失する (4, 7)。リジェネクチンは通常体液中に存在するので、再生芽に検出されるリジェネクチンは体液に由来する可能性と、再生芽で *de novo* に合成された可能性が考えられる。このリジェネクチンの発現機構の解析は、再生の分子機構を理解する上で重要であると考えられた。そこでまず、リジェネクチンの cDNA クローニングを行い、再生芽で遺伝子が発現するかどうか解析した。同じ体液性レクチンである LPS-結合タンパク質の cDNA が既に、体液タンパク質の産生器官である脂肪体の cDNA ライブラリーから単離されていたので、脂肪体の発現 cDNA ライブラリーのイムノスクリーニングを行い、cDNA を単離した。

cDNA の解析の結果、リジェネクチンは 238 個のアミノ酸からなり、N 末端側には分泌タンパク質に共通に見られるシグナル配列を持つこと、N-結合型糖鎖の付加シグナルを有することが判明した。また、C-タイプレクチンに共通に保存されてい

ognition domain conserved among various C-type lectins was found at its C-terminal side. In addition, regenectin showed about 40% sequence identity with the LPS-binding protein, suggesting that they belong to the same protein family (*Periplaneta* lectin family) (Arai, T. *et al.*, manuscript in preparation).

Next, we performed Northern blot hybridization of regenerating legs and found that mRNA for regenectin was expressed in the legs during the middle regenerative stage, 10 to 15 days after operation. *In situ* hybridization revealed that regenectin mRNA is expressed in the epidermis surrounding the regenerating legs but not in the myoblasts. Furthermore, the mRNA was not detectable in the normal developmental stages. Thus, regenectin may be an epimorphosis-specific paracrine factor which participates in the formation of muscle tissue after being secreted from the epidermis (Fig. 1).

The 26-kDa lectin is localized around the epidermis in the middle regenerative stage, suggesting that the 26-kDa lectin participates in the formation of the epidermis, before regenectin prompts muscle formation. Morphogenesis in animal limb development begins with the formation of epidermis covering the wound and is promoted by mutual interaction between the epidermis and the mesenchyme below the epidermis (13, 14). Therefore, regenectin is an excellent candidate molecule for participation in this interaction. However, we have yet to show that regenectin and the 26-kDa lectin do participate in leg regeneration.

C. Function of *Periplaneta* Humoral Lectins as Opsonins

When regenectin and the LPS-binding protein were shown to belong to the same lectin family, we tested whether regenectin and other *Periplaneta* humoral lectins participate in the defense system. To do this, we examined the inhibitory effects of LPSs derived from LPS-deficient mutant strains of *Salmonella minnesota* or *E. coli* on the hemagglutinating activity of these lectins. We found that the agglutinating activity of *Periplaneta* lectin against sheep red blood cells was inhibited by Re-type LPS with 2-keto-3-deoxy octonate (KDO) at its terminus or by KDO itself, but not by Lipid A lacking KDO or Ra-type LPS with a hexose core beyond the KDO residue (12). These results indicate that *Periplaneta* lectin has KDO-binding activity. As KDO is an indispensable sugar moiety of LPS of Gram negative bacteria, it is possible that *Periplaneta* lectin participates in the defense system against Gram negative bacteria.

To test this possibility, we examined whether *Periplaneta* lectin participates in the elimination of *Salmonella minnesota* R-595 with Re-type LPS; we injected an aliquot of a suspension of this bacteria into the abdominal cavity of the cockroach and examined the viable cell number in the hemolymph at various times after injection. The results indicated that most of the bacteria were eliminated within 1 h. Next, we injected various forms of LPS together with bacteria and examined the effect

る糖結合ドメインを、C末端側に有することがわかった。LPS-結合タンパク質とは全長に渡って約40%の相同性を持つことから、両者は同一のファミリー (*Periplaneta* レクチンファミリー) に属するレクチンであると考えられた (Arai, T. *et al.*, manuscript in preparation)。

次に、得られた cDNA をプローブとして再生芽のノザンブロット解析を行ったところ、リジェネクチンの mRNA は肢を切断してから10から15日目の、再生中期から後期にかけて再生芽自身で発現していることが明らかになった。また、その発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析したところ、再生肢を縁取る上皮組織で発現が認められたが、再生芽の筋芽細胞ではほとんど発現していないことが判明した。また、胚形成過程には発現は認められなかった。従って、リジェネクチンは再生芽の上皮組織で特異的に合成、分泌されて筋組織の形成に働くパラクライン因子である可能性がある (図1)。

26-kDa レクチンが再生中期に上皮組織の周囲に一過的に局在することと考え合わせると、肢の再生過程では、まず26-kDa レクチンが上皮組織の形成に働き、次に、上皮組織がリジェネクチンを発現、分泌することにより、その内部で筋組織の形成が促進されるという図式が考えられる。今後、リジェネクチンや26-kDa レクチンが、実際に再生芽の形態形成に働くかどうかについて検証することが必要であるが、動物の肢芽形成が一般に、上皮組織の形成により開始され、上皮組織と間充組織の相互作用により形態形成が進行することを考えると (13、14)、リジェネクチンはまさしく再生芽における上皮組織-間充組織の相互作用を担う分子なのかも知れない。

C. *Periplaneta* レクチンファミリーのオプソニン作用

リジェネクチンと LPS-結合タンパク質が、一次構造上、同一のレクチンファミリーに属することが判明したので、リジェネクチンを含めて、これまでに精製された他のレクチンに関しても感染防御に働く可能性を検討した。まず、それぞれのレクチンの血球凝集活性に対する、サルモネラ菌や大腸菌の LPS 欠損変異株の LPS による阻害効果を調べた。その結果、リジェネクチンや26-kDa レクチンに関しては、LPS 結合性は認められなかったが、*Periplaneta* レクチンのヒツジ赤血球凝集活性が、末端に2-keto-3-deoxy octonate (KDO) を露出した Re タイプ LPS や KDO 自身によって阻害され、KDO を欠いた Lipid A の部分だけや、KDO の先にヘキソースコアの構造を持つ Ra タイプ LPS では阻害されないことがわかった (12)。このことは、*Periplaneta* レクチンが KDO 結合性を持つことを示している。KDO はグラム陰性菌の LPS の必須な構成糖なので、*Periplaneta* レクチンはグラム陰性菌に対する感染防御に働く可能性がある。

そこで、*Periplaneta* レクチンが実際に、Re タイプの LPS を持つサルモネラ菌 (*S. minnesota* R-595) の排除に働くかどうか調べた。まず、この菌の懸濁液をワモンゴキブリの腹部に注入し、時間経過を追って体液を回収し、残存する生菌数を調べたところ、1時間後にはほとんどの菌が排除されていることがわかった。そこで、菌と同時に各種の LPS を注入することによ

Fig. 2. Inhibition of clearance of *Salmonella minnesota* (Re-type) by various types of LPS. Adult American cockroaches were treated with 1×10^6 bacteria and 500 μ g of various types of LPS and kept for 1 h at 27°C. Then, the viable cell number in the hemolymph was determined. The substances injected were: (2) saline only; (3) lipid A; (4) *S. minnesota* Re-type LPS; (5) *E. coli* Re-type LPS; (6) *S. minnesota* Ra-type LPS; (7) *E. coli* Ra-type LPS. (1) shows the viable cell number just after the injection.

on the elimination of bacteria. We found that the elimination of bacteria was inhibited when Re-type LPS from *S. minnesota* or *E. coli*, which inhibits *Periplaneta* lectin activity, was injected, but not when Lipid A or Ra-type LPS, which do not inhibit *Periplaneta* lectin activity were injected as shown in Fig. 2 (12). These results suggest that *Periplaneta* lectin participates in the elimination of bacteria as an LPS recognition molecule.

As *Periplaneta* lectin and the LPS-binding protein recognize different LPS structures, they might form a joint defense system to eliminate various infectious bacteria. As we have not isolated cDNA for *Periplaneta* lectin, the mode of expression of the gene is unknown. However, expression of the genes for regenectin and the LPS-binding protein in defense and epimorphosis was quite different. The gene for the LPS-binding protein was activated transiently in the fat body when bacteria were injected into the abdominal cavity, but it was not expressed in the regenerating legs. By contrast, the gene for regenectin was expressed in the regenerating legs but it was not expressed when bacteria were injected (Arai, T. *et al.* unpublished results). Therefore, we think these lectins evolved from the same ancestral gene and acquired specialized functions in epimorphosis and defense by evolving different sugar specificities and controls of gene expression (Fig. 3).

り、菌の排除が阻害されるかどうか調べた。その結果、図2に示すように、*Periplaneta* レクチンの活性を阻害するサルモネラ菌や大腸菌の Re タイプの LPS を注入した場合には菌の排除が阻害され、活性を阻害しない Lipid A や Ra タイプの LPS を注入した場合には阻害されないことがわかった(12)。このことは、*Periplaneta* レクチンが LPS の認識分子として菌の排除に働くことを示唆している。

LPS-結合タンパク質と *Periplaneta* レクチンが認識する LPS の構造が異なることから、これらのレクチンはネットワークを構成して感染菌の排除に働くと考えられる。*Periplaneta* レクチンの cDNA は単離されていないので、その遺伝子発現は不明であるが、リジェネクチンと LPS-結合タンパク質の再生芽と感染時における遺伝子発現は、対照的であった。LPS-結合タンパク質の遺伝子は、細菌の注入により脂肪体で緊急応答的に発現するが、肢の再生芽では発現は認められない。一方、リジェネクチンの遺伝子は再生芽で発現するが、細菌感染時の誘導性を持たない (Arai, T. *et al.* unpublished results)。従ってこれらのレクチンは、同一の祖先型遺伝子から派生したにも関わらず、分子進化の過程で、異なる糖特異性と遺伝子発現様式を獲得することにより、器官再生と感染防御へと役割分担したと考えられる (図 3)。

Fig. 3. Model of the possible molecular evolution of the *Periplaneta* lectin family.

D. Molecular Cloning of cDNAs Encoding New Members of the *Periplaneta* Lectin Family

During the process of cloning the cDNA for *Periplaneta* lectin, we isolated five cDNAs encoding novel lectin-like proteins that belong to the *Periplaneta* lectin family. We performed RT-PCR using primers corresponding to the partial amino acid sequences of *Periplaneta* lectin and a fat body cDNA library as a template. As partial amino acid sequences of *Periplaneta* lectin resembled sequences of the LPS-binding protein, we extracted an amplified band with a predicted size (250 bp) from an agarose gel, subcloned the DNA and found that there were five kinds of cDNA fragments encoding novel lectin-like proteins. Almost full length cDNAs were isolated by screening the cDNA library again using these cDNA fragments as probes.

The five clones obtained encoded proteins with 40% to 50% sequence identity with each other and with *Periplaneta* lectin or the LPS-binding protein and they shared carbohydrate-recognition domains which are conserved among various C-type lectins. However, three amino acid residues reported to be important in the recognition of sugar moieties and calcium were not always conserved among these lectin-like proteins (15). These results suggest that a lectin-related protein family exists in this insect, and that regenectin and LPS-binding protein are members of the family. The functions of these proteins are unknown at present, but we assume that they also participate in the defense system or morphogenesis in epimorphosis.

E. Discussion

Humoral lectins are reported to exist not only in insects but also in various invertebrates, and are thought to be closely related to the body organization of invertebrate animals (16-22). We have been testing the hypothesis that insect humoral lectins participate in epimorphosis as cell adhesion molecules. In particular, regenectin may play a role in epidermis-mesenchyme interactions during leg regeneration. The importance of

D. *Periplaneta*レクチンファミリーの新規なレクチン様タンパク質のcDNAクローニング

我々はまた、*Periplaneta*レクチンのcDNAクローニングを行う過程で、同じファミリーに属する5種類の新規なレクチン様タンパク質のcDNAを単離することに成功した。方法はまず、*Periplaneta*レクチンの部分アミノ酸配列を決定し、これに対応するプライマーを用いて脂肪体ライブラリーを鋳型にしたPCRを行った。*Periplaneta*レクチンの部分アミノ酸配列は、LPS-結合タンパク質の一次構造とよく類似していたので、両者の比較から期待されるサイズ (250bp) のバンドをアガロースゲルから切り出してサブクローニングしたところ、これらは5種類の新規なレクチンをコードするcDNA断片であることがわかった。そこで、これらのcDNA断片をプローブとして再度ライブラリーをスクリーニングし、ほぼ全長を含むcDNAを単離した。

得られた5種類のクローンは何れも相互に、またリジェネクチンやLPS-結合タンパク質とも、40~50%の相同性を示し、C-タイプレクチンに共通な糖認識ドメインの構造を有していた。しかしながら、糖とカルシウムとの結合に関与するとされる糖認識ドメイン中の3つのアミノ酸残基に関しては、これらのクローンでは必ずしも保存されていなかった (15)。この結果から、この昆虫には基本骨格が同じで少しずつ構造が異なるレクチン様タンパク質のファミリーが存在し、リジェネクチンやLPS-結合タンパク質もこのファミリーに属すると考えられる。現時点では、これらのクローンがコードするタンパク質の機能は不明であるが、これらのタンパク質も、再生芽の形態形成や感染防御に働く可能性がある。

E. 考察

体液性レクチンの存在は、昆虫ばかりでなく多くの無脊椎動物で知られており、無脊椎動物の体制と深く関わると考えられる (16-22)。我々は、昆虫の体液性レクチンが細胞接着因子として器官再生に関わる可能性を検証してきた。特にリジェネクチンに関しては、再生芽における上皮組織-間充織の相互作用を担う分子である可能性が考えられる。鳥類の翅芽形成やイモリ

interaction between the epidermis and mesenchyme has long been recognized in limb bud formation of bird or amphibian limb regeneration (13, 14), and some molecules that participate in that interaction have been identified (23–26). However, regenectin differs from these molecules in that it appears to function only during epimorphosis and not in normal development. Why are epimorphosis-specific cell adhesion molecules needed?

One possibility is that the cells of the regenerating limb might require different adhesion molecules from those needed for normal development in order to avoid noxious interactions with neighboring normal tissues (*e.g.* confinement of inhibitory signals for proliferation to normal tissue, or stimulatory signals to the regenerating tissue). A hypothetical organism that first evolved a body cavity would have to be able to eliminate foreign substances that invaded the body cavity (*e.g.* infectious bacteria) and to restore body structures, when its body was heavily damaged. We believe that members of the humoral lectin family evolved from a common ancestral gene and were involved in the recognition and elimination of foreign substances as well as acting as epimorphosis-specific cell adhesion molecules.

The humoral lectin family of the cockroach is worthy of note because it may function not only in epimorphosis-specific cell adhesion but also as a sugar-oriented defense system which has not been discovered in vertebrates. It is important to now examine how relevant the existence of this lectin family is to other organisms.

の肢の再生では、こうした上皮組織と間充織の相互作用の重要性が古くから指摘され (13、14)、近年、こうした組織間相互作用に働く分子が同定されている (23–26)。しかしながら、リジェネクチンは再生芽でのみ機能し、正常な発生段階では機能しないと考えられる点で、これらの分子とは異なっている。では、再生芽に特異的な接着因子が必要とされる蓋然性はどこにあるのであろうか？

今回我々は、肢の再生芽に発現するリジェネクチンが、感染時に誘導されて感染防御に働く LPS-結合タンパク質と同じファミリーに属することを見出した。このことは、器官再生が感染防御と共通の分子の側面を持つことを示唆している。

一つの可能性として、失われた器官が再生される際に再生芽の細胞は、隣接する正常組織の細胞との不必要な相互作用を遮断する (正常細胞の増殖抑制刺激と、再生芽の増殖促進刺激の隔離など) ために、正常組織とは異なる特別な接着分子を利用する必要があったのではないだろうか。進化の過程で体腔を持つ多細胞生物が初めて誕生したとき、その生物は体制が破綻した際に、体腔内に侵入する異物 (感染菌など) を排除し、失われた部分を再生する能力を必要としたと推察できる。その際、異物を認識し排除する分子と、再生細胞が一時的に必要なとする接着分子に、共通の祖先型遺伝子から派生したレクチンファミリーが利用されたと考えられる。

ワモンゴキブリで発見されたレクチンファミリーは、真再生に固有な細胞接着分子としての可能性を持つばかりでなく、脊椎動物では見つからない、糖鎖を標的とした生体防御機構としても注目される。今後は、こうしたレクチンファミリーの存在意義が、どれだけ多くの生物種に敷衍できるものか検証することが重要な課題である。

References

1. Turby, P. R. (1983) *J. Embryol. Exp. Morphol.* **75**, 151–164
2. Kunkel, J. G. (1981) in *The American Cockroach* (W. J. Bell, and K. D. Adiyodi, eds.) pp.425–443, London, New York, Chapman and Hall
3. Kubo, T., and Natori, S. (1987) *Eur. J. Biochem.* **168**, 75–82
4. Kubo, T., Kawasaki, K., and Natori, S. (1990) *Insect Biochem.* **20**, 585–591
5. Jomori, T., Kubo, T., and Natori, S. (1990) *Eur. J. Biochem.* **190**, 201–206
6. Kubo, T., Kawasaki, K., and Natori, S. (1993) *Dev. Biol.* **156**, 381–390
7. Kubo, T., Kawasaki, K., Nonomura, Y., and Natori, S. (1991) *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 83–90
8. Kubo, T., Kawasaki, K., and Natori, S. (1991) *Seibutsu* **31**, 306–312
9. Kubo, T., and Kawasaki, K. (1992) *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **37**, 810–819
10. Jomori, T., and Natori, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13318–13323
11. Jomori, T., and Natori, S. (1992) *FEBS Lett.* **296**, 283–286
12. Kawasaki, K., Kubo, T., and Natori, S. (1993) *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**, 675–680
13. Hurlle, J. M., Ganani, Y., and Macias, D. (1989) *Dev. Biol.* **132**, 368–374
14. Rowe, D. A., Cairnes, J. M., and Fallon, J. F. (1982) *Dev. Biol.* **93**, 83–91
15. Kawasaki, K., Kubo, T., and Natori, S. (1996) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 355–364
16. Marchalonis, J. J., and Edelman, G. M. (1968) *J. Mol. Biol.* **32**, 453–465
17. Hammarstrom, S., and Kabat, E. A. (1969) *Biochemistry* **8**, 2629–2705
18. Giga, Y., Sutoh, K., and Ikai, A. (1985) *Biochemistry* **24**, 4461–4467
19. Suzuki, T., Takagi, T., Furukohri, T., Kawamura, K., and Nakauchi, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1274–1281
20. Komano, H., Mizuno, D., and Natori, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2919–2924
21. Komano, H., and Natori, S. (1985) *Dev. Comp. Immunol.* **9**, 31–40
22. Kawaguchi, N., Komano, H., and Natori, S. (1991) *Dev. Biol.* **144**, 86–93
23. Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, Ed., and Tabin, C. (1993) *Cell* **75**, 1401–1416
24. Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., and Martin, G. R. (1993) *Cell* **75**, 579–587
25. Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G. R., and Tickle, C. (1994) *Nature* **371**, 609–612

26. Laufer, Ed., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., and Tabin, C. (1994) *Cell* **79**, 993–1003

Received on June 10, 1996, accepted on June 26, 1996

Profile of the Author

Takeo Kubo

Graduated from University of Tokyo in 1983, and obtained Ph.D. in Pharmaceutical Science at University of Tokyo in 1991. The title of the thesis was “Humoral lectins that appear in the regenerating legs of American cockroach *Periplaneta americana*”.

He started professional carrier at University of Tokyo as an research assistant (1987–1992), and then , as a lecturer (1992–1995). Now, aassociate professor of University of Tokyo.

(Main themes)

1. Study on the molecular mechanisms of epimorphosis.
2. Study on the molecular basis of insect (honeybee) sociality.