

# 昆虫器官再生機構の解明とその応用への基盤研究

早川 洋一 [佐賀大学農学部／教授  
(前北海道大学低温科学研究所／助教授)]

丸田 幸男 [株式会社ラボ／研究受託センター長]

柳舘 拓也 [株式会社ラボ／研究員]

## 背景・目的

私達は、15年程前に寄生バチによって寄生され、その幼虫発育が著しく遅れた宿主昆虫の血液から発育遅延の原因物質と考えられる新規生理活性ペプチドを発見した。この精製ペプチドを未寄生宿主幼虫に注射することにより、その発育が顕著に遅れたことから発育阻害ペプチド(Growth-blocking peptide, GBP)と命名し、以来、このGBPについて多角的な解析を行ってきた。まず、その研究成果の中で特筆すべき点は、GBPが培養細胞に対する細胞増殖活性や昆虫血球細胞に対する活性化作用といった多機能性を有することを明らかにしたことである。こうした研究知見に基づき、GBPが昆虫で初めて確認されたサイトカインであることを報告してきた。また、これまで複数の昆虫種で類似のペプチドを同定することができたが、ただ、いずれも鱗翅目(ガやチョウの仲間)に限られていた。しかしながら、ごく最近、このサイトカインファミリーに属するものと考えられるペプチドを双翅目昆虫(ハエ)に発見した。この事実は、GBPペプチドファミリーが広く昆虫全般に存在する可能性を示唆するものと解釈できる。そこで、さらに異目種の昆虫でも同定しようと甲虫目に属するジャイアントミールワーム幼虫の血液成分の分析を開始した。

サイトカイン(血球細胞を活性化する生理作用を指標とする)を単離する為、数多くのジャイアントミールワーム幼虫から血液を採取する過程で、採血の為に切り取った肢が再生することに気付いた。早い場合には、約2週間で新たな再生肢が現れ、約1ヶ月後には9割以上の個体で再生肢が確認できた。これまでも、ゴキブリなどで再生現象の報告はあるが、これほどの再生速度、成功率ではない。

GBP及びGBP同族ペプチドが、現在、昆虫で知られる唯一の昆虫サイトカインである。したがって、昆虫サイトカインについての知見は極々限られているのが現状である。さらに、昆虫の各種器官の再生現象について、その存在に関する記述的報告は以前からあるものの、その分子機構についての解析例はほとんど皆無に等しい。サイトカインの主たる特徴の一つはその多機能性にある。例えば、GBPの場合、現時点で証明されている生理機能は、幼虫発育遅延作用、細胞増殖活性、血球活性化作用、幼虫麻痺誘起作用と非常に多岐に渡っている。こうした多機能性を考えると、昆虫各種器官の再生現象へのGBP

様サイトカインの寄与も十分あり得るものと予想される。こうした現状を踏まえ、私達は昆虫サイトカインを基軸に、ジャイアントミールワーム幼虫の再生肢出現の分子機構の解析を開始した。

## 内容・方法

ジャイアントミールワーム幼虫の胸部歩行肢に見られる強力な再生能力を支える分子機構を解析する為に、まず、肢切断残存部位の形態観察、さらには、その組織内の細胞周期解析などを通して再生現象の確認とそれを支える細胞の性質を調べた。さらに、肢切断1週間後の残存組織から細胞抽出液を調製し、その細胞増殖因子活性を測定した。その結果、抽出液中に昆虫培養細胞に対する顕著な細胞増殖活性を確認することができた。したがって、本研究では、まず、この細胞成長因子を単離することを第一目標に据えた。さらに、切断後の残存組織細胞内でのサイトカインシグナル伝達関連遺伝子の発現活性変動を解析する目的で、DNAアレイを用いて再生肢形成過程でその発現が増加(あるいは減少)する遺伝子の同定を試みた。

以下に、具体的実験方法を記す。

### 1)フローサイトメーターによる切断後の残存組織細胞の細胞周期解析

ジャイアントミールワーム終齢(次回の脱皮で蛹に変態する)幼虫歩行肢3対6本の内の1本を第2関節部位で切断し、1週間後に残存肢をその付け根から切り取る。この組織を市販のCycleTEST PLUS DNA Reagent Kit(BECTON DICKINSON社)を用いて処理し、フローサイトメーター(BECTON DICKINSON社)を用いて細胞周期を測定した。

### 2)ジャイアントミールワーム幼虫の肢切断後残存組織からのペプチド成分の抽出と細胞増殖因子の単離、精製、構造決定

ジャイアントミールワーム終齢幼虫の胸部歩行肢(3対計6本)の1本を第2関節部位で解剖ハサミを用いて切断する(コントロールの残存組織抽出液を調製する為には、この直後に肢の付け根から切断し後述のように抽出液を調製する)。この切断から1週間後に、肢の付け根から再び残存肢を切断し、すぐに、氷上で冷やした50%アセトン水溶液(0.05%phenylthiourea)に入れる。10本残存肢に対して200 $\mu$ l冷アセトン水溶液を加え、超音波破碎を行う。破碎後、15,000rpmで15分間(4℃)遠心し、上清を集めて凍結乾燥する。

凍結乾燥品を0.1% Trifluoroacetate(TFA)水溶液に再溶解し、これを逆相系高速液体クロマトグラフィー(reversed phase HPLC)カラム(C18カラム(150 $\times$ 4.6mm))によって分析する。溶出液には0.05% TFA水溶液

(A液)と0.05% TFAアセトニトリル(B液)を用い、A液に対するB液の濃度を徐々に上昇させる条件によって目的のペプチド含む分画を溶出させた。次に、C4カラム(250×4.6mm)を用い、同じ溶出液でグラジエントプログラムを変えることによって活性分画の精製度を上げた。最後に、C18カラム(250×4.6mm)の2本連結カラムを用いて最終的に活性ペプチドを1本のピークとして精製することに成功した。なお、活性測定については後述する。

得られた活性ペプチドはヨードアセトアミドを用いてカルボキシメチル化した後、再び、ODSカラムによって精製し、ペプチドシークエンサーによってアミノ酸配列の決定を行った。カルボキシメチル化処理は、ペプチド鎖内に存在する可能性のあるシステインをペプチドシークエンサーによって検出するためである。また、分子量の推定は、分取した活性ペプチドピークを冷凍遠心濃縮機によって濃縮し、TOF MASSスペクトロメーターによって行った。

### 3) ジャイアントミールワーム幼虫血球細胞活性化測定

ジャイアントミールワーム終齢幼虫の歩行肢一本を切断し、氷上で冷やした600 $\mu$ lの抗凝集バッファー(98mM NaOH, 186mM NaCl, 17mM Na<sub>2</sub>EDTA and 41mM citric acid, pH adjusted to 4.5)中へ採血する。1,000gで1分間遠心し、上清を捨てたのち、再び、800 $\mu$ lの抗凝集バッファーを添加しピペットで細胞を懸濁し氷上で1時間放置する。放置後、再び1,000gで1分間遠心し、上清を捨てた後、Excell 400メディアム中に懸濁する。96穴プレートにサンプル5 $\mu$ l、血球細胞懸濁液を40 $\mu$ l添加し、15-20分後に細胞塊を形成した血球の割合を倒立顕微鏡下に観察、計算する。

### 4) 細胞増殖活性の測定

昆虫培養細胞HighFiveを5% FBS(Fetal Bovine Serum)を含むGrace's insect mediumで継代培養し、対数増殖期にある細胞を1% FBS/Grace's insect mediumに移し替えた後に96穴の培養プレートの各ウェルに約5,000細胞ずつ蒔く。プレートに細胞を蒔いた2日後に、各サンプル及び0.5 $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-thymidineを添加して、さらに2日間、25℃で培養する。この後、各ウェルのHighFive細胞を遠心と生理塩水中での懸濁を繰り返してよく洗浄する。遠心、懸濁による洗浄を3回繰り返した後に、集めた細胞への [<sup>3</sup>H]-thymidineの取り込みを液体シンチレーションカウンターによって測定する。この際、コントロールとしてサンプルの代わりにBSAをほぼ同程度のタンパク質濃度にして用いる。

### 5) DNAアレイによるジャイアントミールワーム終齢幼虫再生肢部位における遺伝子発現解析

ジャイアントミールワーム終齢幼虫歩行肢3対6本の内の1本を第2関節部位で切断し、1週間後に残存肢をその付け根から切り取る。切り取った組織よりTRIzol reagent

(Invitrogene)を用いてtotalRNAを抽出し、これを鋳型にしてRT-PCRによってcDNAsを合成する。この際、Gene Navigator(R)cDNA Amplification system ver.2(東洋紡)を用いて3'末端にビオチン標識し、このビオチン標識cDNAsをプローブに用いてDNAアレイ解析を行った。DNAアレイはマウス免疫関連遺伝子をスポットしたもの(mouse inunology, 東洋紡)を用いた。コントロール実験は、同じくジャイアントミールワーム終齢幼虫の1肢を第2関節部位で切断し、その直後に、残存肢を付け根から切り取って、そこからtotalRNAを抽出して用いた。

## 結果・成果

### 1) ジャイアントミールワーム終齢幼虫再生肢出現過程の形態観察

ジャイアントミールワーム幼虫は胸部下方左右に3対計6本の歩行肢を持つ。終齢幼虫期にこの内の1本を切断し、経時的に切断部位の観察を続けた。図1は、切断後1週間、2週間、4週間後の切断部位の形態を示した。一見して明確なように、切断1週間後ではほとんど再生肢の出現が確認できなかったものの、2週間後には1部の個体でほんの小さな再生肢が確認できた。さらに、4週間目では大多数の個体で正常肢に近い(長さはまだ少し正常なものより短い)形態をもつ再生肢が確認できた。

合計40匹のジャイアントミールワーム終齢幼虫の歩行肢の一本を切断し、その後の再生肢の出現過程頻度を経時的に観察した。図2に示したように1週間後に再生肢が認められた個体は無いものの、2週間後では約15%の個体で認められた。さらに、3週間、4週間と再生肢の出現率は上昇し、5週間目では90%以上の個体で再生肢が出現していた。以上の結果より、再生肢の成長は切断直後から始まり、外形形態として認識できるまでに成長するには約2-3週間を要することが明らかになった。したがって、細胞レベルでの変化—すなわち、再生肢を形成する為の細胞分裂は、やはり歩行肢切断直後から始まるものと予想された。次に、この点を確かめる実験を行った。

### 2) ジャイアントミールワーム終齢幼虫歩行肢切断後の残存組織細胞の細胞周期の測定

ジャイアントミールワーム終齢幼虫の歩行肢の一本を第2関節で切断し、その後、再生肢が現われるまでの残存組織内細胞の細胞周期を解析した。特に、ここでは最初の切断から1週間後に残存肢を付け根から切り取り、この組織内細胞の細胞周期を解析した。コントロールには、まず、終齢幼虫の歩行肢を第2関節で切断し、その直後に残った肢組織を付け根から切り取りこれを用いた。この結果は、図3に示した。コントロール組織細胞のG0-G1期が40-50%、G2-M期が



12-15%であるのに対して、切断後1週間目の細胞はG0-G1が38%前後、G2-M期が44-55%であった。すなわち、コントロールに比べて初回切断から1週間後の残存肢内細胞においては、G2-M期の細胞が顕著に増加していることが明らかとなった。したがって、切断後の残存組織内では何らかの細胞増殖作用が働き、G0-G1期にあった細胞が活性化されG2-M期へ移行したものと解釈できる。それでは、こうした細胞周期の変化はどのような分子レベルでの影響によるものか?それが、本研究の次なるターゲットとなった。

### 3) ジャイアントミールワーム終齢幼虫歩行肢切断後の残存組織細胞を休止期から分裂期に向わせる内的要因

フローサイトメーターによる解析の結果、ジャイアントミールワーム幼虫の歩行肢切断という外的刺激は、残存する切断部位近傍の細胞の細胞周期をG0-G1期(休止期)からG2-M期(分裂期)に向わせることが明らかになった。本研究の目的は、この細胞周期の変化を誘起する分子レベルでの要因を明らかにすることである。

そこで、次に、1回目の歩行肢第2関節での切断から1週間後に残存部位(付け根から第2関節まで)を集め、-20℃50%アセトン水溶液中でホモジェナイズすることによってペプチド分画を抽出した。遠心後の上清を凍結乾燥した後、生理塩水に再溶解し昆虫細胞HighFive培養系に添加してその生理効果を見た。その結果、調製したペプチド粗抽出液は明らかな細胞増殖活性を示すことが確認できた(図4)。そこで、この粗抽出液を逆相系HPLCカラム(C18,150×4.5mm)によって分画し、再び、細胞増殖活性を測定した。その結果、保持時間50分前後で溶出する分画にコントロールに比べて約15%程度の細胞増殖活性の上昇が観察された。この活性分画を再び逆相系HPLCカラム(C4,250×4.5mm)によって分画し細胞増殖活性を測定したが、残念ながら、いずれのピークにも活性を確認することができなかった。これは、恐らく、細胞増殖活性測定の感度の問題と考えられる。すなわち、アッセイに用いたHighFive細胞はコントロールとして添加したBSA(牛血清アルブミン)でもある程度の細胞増殖は続く。したがって、このアッセイ系で確認できる細胞増殖因子は、このコントロール値を上回る細胞増殖を誘起しなければならない。第2段階目のC4カラムから回収したペプチド分画には、こうしたコントロール値を凌ぐだけの細胞増殖活性がなかったものと解釈した。

この段階で、私達は、目的の活性ペプチドを単離する為のアッセイ方法について種々の再検討を行い、最終的に、アッセイ方法として細胞増殖活性測定より感度が良く、さらに、測定に要する時間も短い血球活性化作用測定に切り替えた。勿論、これは一種の回り道であり、最終精製標品が十分量得られた段階で、もう一度、細胞増殖活性の確認が必要で

はある。ただ、これまで研究してきたGBPや他の相同サイトカインは、いずれも、血球活性化と細胞増殖活性を併せ持つ。さらに、第1段階目の逆相系HPLCカラムによって分離した細胞増殖活性を有する分画は血球細胞に対して顕著な活性化作用を示した。したがって、恐らく、今回ターゲットにしているジャイアントミールワームの活性ペプチドも両活性を示すものと予想した訳である。

第2段階目のC4カラム溶出分画についてアッセイ法を変え再測定したところ、保持時間35分前後に活性ペプチド分画を確認できた。この活性分画を再び連結C18カラム(250×4.5mm HPLCカラムを2本タンデムに繋ぐ)によって分離した。同じ連結カラムを用いて2回のクロマトグラフィーによって単一のピークとして精製が完了した。さらに、この精製ペプチドをヨードアセトアミドを用いてカルボキシメチル化を行い、再び、連結C18カラムで精製してペプチドシーケンサーによってアミノ酸配列分析を行った。図5Aに示したようにアミノ末端から24残基の配列決定に成功した。質量分析の結果(図5B)、この活性ペプチドの分子量は約4,008と推定されたので、全部で35残基前後のアミノ酸からなるペプチドと予想される。したがって、さらにカルボキシル末端側に約10残基の未同定アミノ酸配列が残っていることになる。

今回精製できたペプチドが予想通り細胞増殖活性を有するものかを検討した。昆虫培養細胞の一種であるHighFive細胞をGraceの昆虫培地で維持し、極力FBSを除いた環境下に今回精製したペプチドを添加した。結果は、図6に示したように、1nM濃度の精製ペプチドで約20%程度の細胞増殖作用が確認することができた。したがって、当初予想したように、今回精製したペプチドは血球活性化と細胞増殖作用を併せ持つことから、昆虫サイトカインの一種であろうと考えられる。

### 4) ジャイアントミールワーム終齢幼虫歩行肢切断後に残存組織細胞内での遺伝子発現解析

ジャイアントミールワーム終齢幼虫においては歩行肢切断後、上記のような細胞増殖因子が機能し残存組織内細胞は活性化されるものと予想される。肢切断後から細胞増殖因子が分泌される過程、さらに、分泌された細胞増殖因子によって刺激を受けた細胞内の情報伝達システムが活性化される過程。こうした器官再生の一連の過程で、その発現が活性化される遺伝子にはどういった種類のものがあるのか?この点を明らかにする為に、DNAアレイを用いて解析を行った。終齢幼虫の歩行肢を切断し、一週間後に残存組織を切り取り、そこからtotalRNAを抽出した。このRNAを鋳型に用いてRT-PCRによってcDNAを調製し、これをプローブに用いてDNAアレイ解析を行った。マウス免疫関連遺伝子DNAアレイを用いたところ、約6種類の遺伝子にポジティブシ

ゲナルがコントロール及びテストサンプルで検出され、その中でGATA-4遺伝子のみが後者のテストサンプルで特異的に約1.7倍発現が高まっていることが明らかになった。

## 今後の展望

本研究では、ジャイアントミールワーム終齢幼虫を実験材料にその歩行肢再生の分子機構についての解析を行った。その結果、大きくは二つの新知見が得られた。

### 1) ジャイアントミールワーム新規サイトカインの単離と構造決定

ジャイアントミールワーム終齢幼虫の歩行肢を第2関節で切断すると、切断直後から何らかの細胞間情報伝達系が活性化し、それまでG0-G1期にあった切断部近傍の細胞はG2-M期に移行して細胞分裂が盛んになる。これは、フローサイトメーターによる切断後の残存肢の細胞周期を解析した結果得られた知見である。さらに、切断後の肢残存組織抽出液は細胞増殖活性を示し、この細胞増殖因子活性は主にペプチド分画に存在することが確認できた。したがって、このペプチド性粗抽出液を大量に調製し、主に逆相系カラムクロマトグラフィーによって精製を進めた。精製の過程で、指標とした生理活性を細胞増殖活性測定から血球活性化作用測定に切り替えて、活性ペプチドを追った。最終的には、両生理活性を併せ持つ新規サイトカインの単離に成功した。精製できたサイトカインは分子量が4,008Daからなるペプチドで、アミノ酸35残基前後と推定される。今回、精製品のペプチドシーケンシングによって、24残基のアミノ酸配列決定に成功したが、約10アミノ酸残基が未同定のまま残ってしまった。今後、早急に配列決定を行うつもりである。

細胞増殖活性の測定には、昆虫培養細胞HighFiveを用いた。この細胞はバキュロウイルスを用いてのin vitro遺伝子発現系に利用されている細胞であり、この細胞に対する細胞増殖因子は基礎、応用を問わず利用価値は高いものと考えられる。

前述のように、今回同定された新規サイトカインはアミノ酸が35-36残基のペプチドで、これまで見つかっているGBP及びその同族ペプチドよりはアミノ酸が10残基ほど長いことになる。それでも、哺乳類のサイトカインに比べるとはるかに低分子量であることから、今後、種々の変異体を作成し医薬品開発を視野にいたれた応用に向けた基礎研究を押し進めるには絶好の研究対象と言える。

### 2) 再生に関わる遺伝子発現解析

ジャイアントミールワーム終齢幼虫歩行肢切断後の残存組織細胞からRNAを調製し、マウスの免疫システムに関与するcDNAのDNAアレイを用いてその遺伝子発現活性の変動を網羅的に解析した。今回の解析では、マウス免疫関連遺伝子をスポットしたDNAアレイを用いたが、その結果、

約6種類のポジティブシグナルがコントロール、テストフィルター共に検出でき、それらの遺伝子の中でGATA-4遺伝子が後者のテストサンプルで特異的発現上昇が確認できた。GATA-4遺伝子とは転写調節因子をコードする遺伝子であり、特に、マウスの赤血球産生に関与する遺伝子と報告されている。今回、私達がRNAを調製した再生肢形成過程にある組織で、なぜこのGATA-4相同遺伝子の発現が高まるものか大いに興味深い。今後の解析によって、器官再生に関与する新たなシグナル伝達系が明らかになる可能性は十分あるものと期待している。

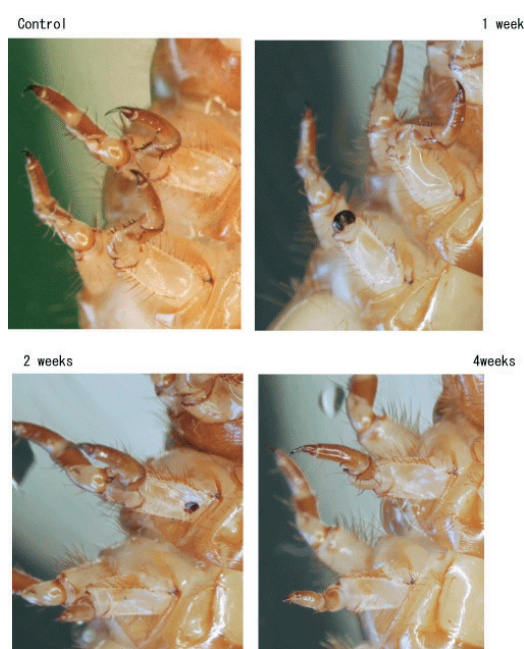


図1

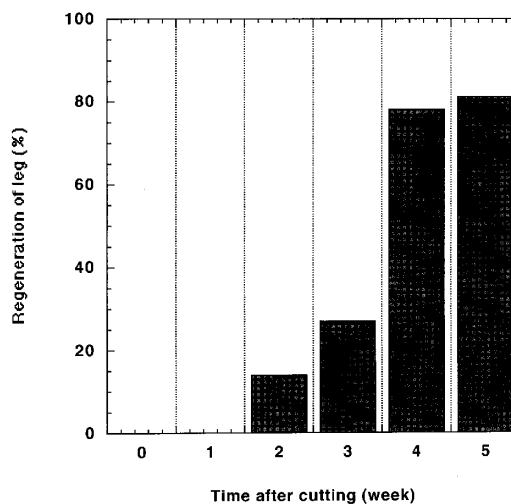


図2

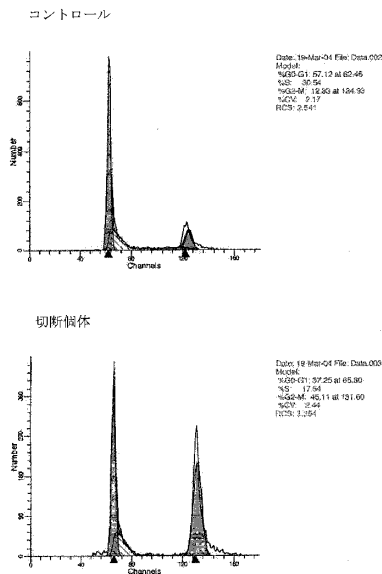


図3

A

1 5 10 15 20 25

AlaAsnGluTrpPro ArgGluHisArgPro PhePheThrLeuLeu AsnAlaAspHisIle GluXSerArgAsn

B

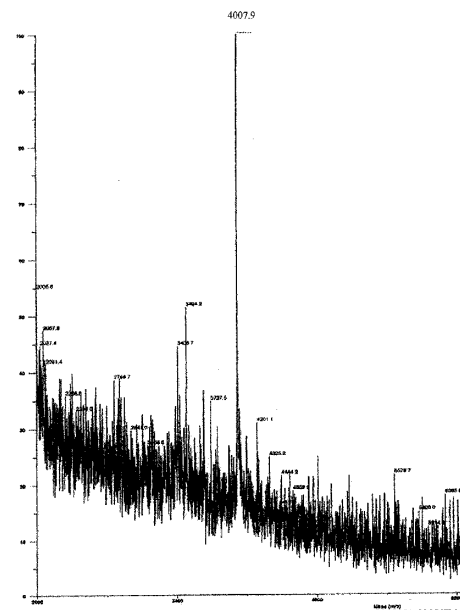


図5

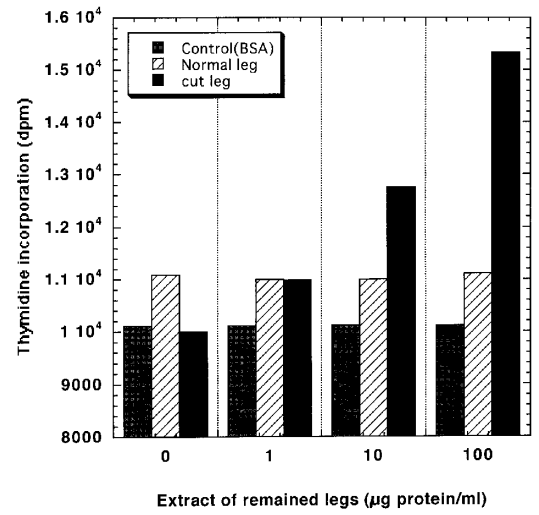


図4

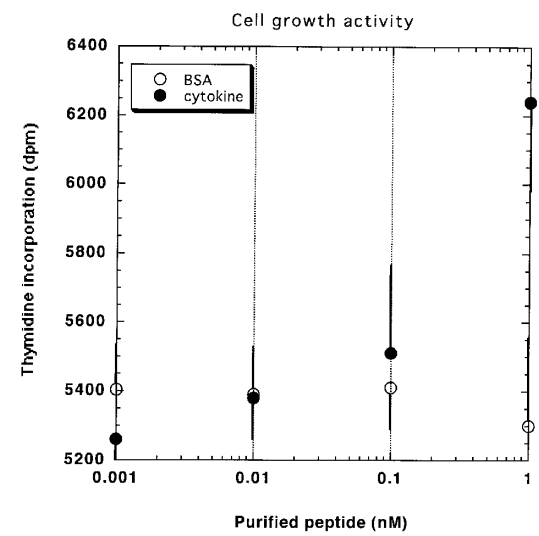
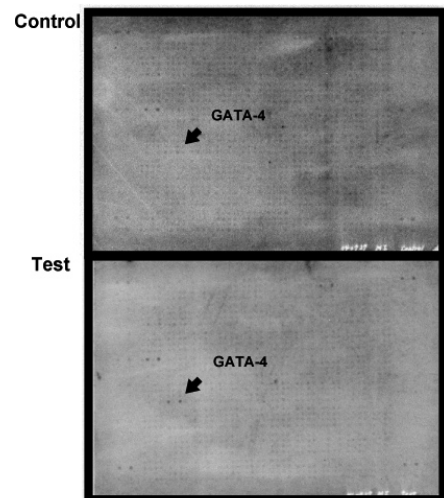


図6



Testサンプルで矢印のGATA-4遺伝子発現が明らかに上昇していることが確認できた。

図7