

アフリカツメガエル L-セレクトインの構造と発現

日大生産工 (院) ○森 和俊

日大生産工 野呂 知加子

1. 諸言

細胞接着分子は、体の形成と維持に重要な役割を持つ。細胞接着分子は単に多細胞生物を機械的に結びつけているだけではなく、組織形成時の細胞の移動や選別の過程に必須である。またその発現や特異性は、発生・分化、病的変化などの状況によってダイナミックに変化する。この結果、1 個の受精卵から体の形ができ、炎症部位に白血球が集まり、ガン細胞が転移するのである。

細胞接着分子には、カドヘリンのように同じタンパク質分子同士が結合するホモフィリック型、およびインテグリンとラミニンのように異種のタンパク質同士が結合するヘテロフィリック型が知られている。タンパク質以外に、糖鎖も細胞接着に関与している¹⁾²⁾。タンパク質と糖鎖が結合する接着分子の例として、セレクトインがある。

セレクトインとは、C-型レクチンに属する膜貫通タイプのタンパク質で、相手細胞の糖鎖を特異的に認識して細胞同士を接着させる機能がある。その構造は、カルシウム依存性 (C 型) レクチンドメイン (L)、上皮増殖因子と相同性のある EGF ドメイン (E)、補体結合分子と相同性のある複数の CBD ドメイン (C)、細胞膜貫通ドメインおよびカルボキシル末端の短い細胞内ドメインから構成される (Fig.1)。

これまでにセレクトインには、リンパ球型 L・血管内皮型 E・血小板型 P の 3 種類のセレクトインが知られており、L-セレクトインは白

血球に、E-セレクトインは血管内皮細胞に、P-セレクトインは活性化血小板表面と血管内皮細胞上に発現している。L-セレクトインは、白血球と血管内皮細胞との接着に関わっており、炎症局所に対しての生体防御機構や、血管から末梢リンパ管へ移行するリンパ球ホーミングに関わっている分子である。

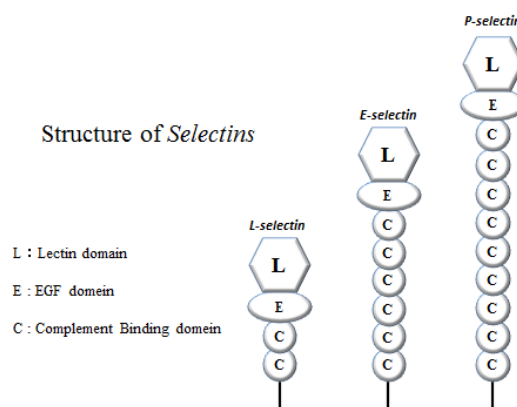


Fig.1 Structure of Selectins

この分子は、これまでに主として哺乳類で発見され研究されているが、他の種での存在やその発現などに関する研究はまだ行われていなかった。野呂らはアフリカツメガエルにもセレクトイン遺伝子が発現していることを発見したが、その遺伝子全貌を明らかにすることはできていなかった。本研究では、近年整備されたアフリカツメガエルのゲノム配列データベースを利用して、そのゲノム配列および遺伝子配列全体を明らかにしたので、その構造と発現組織および時期について報告する。

2. 材料と方法

アフリカツメガエルは、アフリカ原産のカエル *Xenopus laevis* の和名である。飼育が容易であり、あまり時期を選ばずに卵を大量に得る事ができ、初期発生の進行が早いため、発生生物学のモデル生物として、重宝されている。また、近年近縁種で染色体数の少ないあるネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) についてほぼ全てのゲノム配列が明らかになり、*X.laevis* についてもゲノム解析が進行中である。これらのデータは XenBASE³⁾ というウェブサイトに掲載されており、検索が可能である。以前の野呂の研究より得られた cDNA の配列解析データと、データベースのゲノム配列からプライマーを設計した。*X.laevis* の成体、変態中の個体および幼生から mRNA を抽出し、cDNA を作成して RT-PCR 法により *X.laevis* のセレクトイン遺伝子全長配列を増幅した。この PCR 断片を TA クローニング法によりベクターに挿入し、塩基配列を解析した。結果の cDNA 配列をデータベースのゲノム配列と比較して、ゲノム内の遺伝子構成について検討した。

3. 結果と考察

cDNA とゲノム配列の比較の結果、*X.laevis* のセレクトインの構造は、リガンド糖鎖結合部位であるレクチンドメイン、EGF ドメインについて、哺乳類の L-セレクトインと最も相溶性が高かったが、哺乳類 L-セレクトインには 2 つある CBD リピートが 4 つあった。遺伝子データベースに登録されている *X. tropicalis* の E-セレクトインとされている cDNA と最も相溶性が高いが、この遺伝子では CBD リピートが 3 つであった。セレクトイン遺伝子の細胞内ドメインにあたる C 端構造は、それぞれのセレクトインのタイプで保存されている。今回明らかになった全長配列により、この遺伝子は、その C 端構造からも L 型のセレクトインである

ことが示唆された (登録 *X. tropicalis* の cDNA も実は L 型であることがわかった)。ツメガエルのゲノムデータベース XenBASE を利用して、この遺伝子のゲノム構造を解析した。哺乳類や *X. tropicalis* と同様に、各ドメインがそれぞれ別のエクソン上にあり、全部で 11 のエクソンが確認できた。また、哺乳類では同じ染色体上に連続して 3 つのタイプのセレクトイン遺伝子が存在するが、*Xenopus* では同じ箇所に複数のタイプは連続していないと推察された。

次に、この遺伝子の発現を調べた。PCR では卵母細胞から初期胚にかけて発現が若干検出できるものの、顕著になるのは尾芽胚以降で、ノーザンブロットングで 4.2kb の転写物が検出された。この時期の *X.laevis* ではまだリンパ球の分化は見られない。抗体を用いて調べたところ、中期の幼生では心臓や血管中の血液細胞のほとんどすべてがセレクトインを発現していた。これらの細胞は抗幼生型ヘモグロビン抗体と反応し、抗白血球抗体とは反応しないことから、幼生型の赤血球である。一方、変態後期および成体におけるセレクトインの発現は主として脾臓リンパ球にみられる。以上の結果から、変態を経てこのセレクトインの発現部位が変化することが明らかになり、血球発生・分化との関連が示唆された。

【参考文献】

- 1) Yoshida-Noro C, Heasman J, Goldstone K, Vickers L, Wylie C. (1999) Expression of Lewis group carbohydrate antigens during *Xenopus* development. *Glycobiology*. 9(12): 1323-30.
- 2) 野呂知加子 (1995) 発生における”弱い”細胞間相互作用-糖鎖による細胞接着-細胞工学 Vol. 14 No. 11 p 1320-1327)
- 3) XenBASE : <http://www.xenbase.org/entry/>