

センチニクバエの変態期に体液細胞表面に
発現が誘導される 120-kDa 蛋白に関する研究

編 昌平

①

学位論文

センチニクバエの変態期に
体液細胞表面に発現が誘導される
120-kDa 蛋白に関する研究

東京大学大学院薬学系研究科
機能薬学専攻

堀 昌平

目次

略語

第1章 序論	1
第1節 概念的背景	2
第2節 研究の背景	5
第3節 本研究の概要	8
図表	10
第2章 変態期に体液細胞表面に発現する 120-kDa 蛋白の同定と性状解析	12
第1節 序	13
第2節 蛹体液細胞表面と特異的に反応するモノクローン抗体の作製	14
(1) モノクローン抗体を作製する体液細胞の蛹化ステージの検討	14
(2) 蛹体液細胞表面と特異的に反応するモノクローン抗体の作製	17
第3節 蛹化に伴って体液細胞表面に発現する 120-kDa 蛋白の同定	20
(1) イムノブロット法によるモノクローン抗体の認識抗原の同定	20
(2) 免疫沈降法によるモノクローン抗体の認識抗原の同定	21
第4節 蛹化に伴う 120-kDa 蛋白の発現量の変動	23
第5節 120-kDa 蛋白の発現組織の解析	25
第6節 考察	26
図表	29

第3章 120-kDa 蛋白の一次構造解析	41
第1節 序	42
第2節 120-kDa 蛋白の精製	43
第3節 120-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列の決定	44
第4節 120-kDa 蛋白の cDNA クローニング	45
第5節 120-kDa 蛋白の構造的特徴	47
第6節 考察	49
図表	54
第4章 総括と展望	61
第1節 本研究の総括	62
第2節 今後の展望	65
第5章 材料と方法	69
参考文献	85
謝辞	92

略語

bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropane sulfonic acid
CBB	coomassie brilliant blue R-250
DABCO	1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HAT	hypoxanthine-aminopterin-thymidin
HPLC	high performance liquid chromatography
Ig	immunoglobulin
kDa	kilo dalton
MAb	monoclonal antibody
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrilamide gel electrophoresis
SSC	standard saline citrate
ssss DNA	single strand salmon sperm DNA
TBS	Tris buffered saline
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

第 1 章

序論

第1節 概念的背景

19世紀末から20世紀初頭にかけて活躍した免疫学者 Elie Metchnikoff は、ヒトデの幼生にバラのトゲを刺すとその周囲を多数のアメーバ状の細胞が取り囲むという現象を観察した。Metchnikoff はこの現象に想を得て、無脊椎動物から脊椎動物にわたる多くの動物でアメーバ状細胞が細菌などの異物を貪食することを見出してこの細胞をマクロファージと名付け、細胞性免疫の概念を提唱した (Tauber, 1990, 1994a, b; Beck & Habicht, 1996)。現在では、マクロファージは全ての多細胞動物に普遍的に存在して自然免疫において中心的な機能を担うばかりでなく、脊椎動物に固有な獲得免疫においても抗原提示細胞として T 細胞が活性化するか不活性化するかを制御することで「自己」「非自己」の識別に中心的な機能を担っていることが明らかにされている (Janeway, 1992)。

ところで、Metchnikoff は、細胞性免疫の概念を確立する一方で、カエルの変態においてマクロファージがオタマジャクシの尾の組織を貪食するという現象を観察し、その生物学的な意味を洞察して次のような仮説を提唱した。すなわち、個体発生と系統発生の起源においては、免疫機構は自己の個体内部に対して向けられており、個体発生の過程で自己の細胞を排除する機構として発生・進化し、のちに同じ機構が二次的に

他の生物個体に対する防御としても働くと考えたのである (Tauber, 1990, 1994a, b)。

現代の免疫学では、免疫機構は「自己」と「非自己」を識別して個体の身体的 identity を守るシステムとして理解されている (多田, 1993)。しかし、現代免疫学が扱っているのは完成された成体の免疫機構であり、個体発生において免疫機構がどのように機能しているのかほとんど問題にされて来なかったと言える。「免疫機構¹は、個体発生過程で個体の組織を構築して個体の identity そのものを確立するシステムとして進化・発生した」という視点は現代にあってもなお新しい概念であり、免疫機構の成り立ちを理解するうえで根本的な視点を与えると思われる。

では、Metchnikoff の仮説は実験的に検証されているのであろうか？ Metchnikoff 以降、主に組織化学的な研究により、マクロファージが個体発生の過程で生じる組織の崩壊や再構成とそれにとまなう細胞死といった極めて重要な過程に関与していることが、多くの動物種のさまざまな組織で示唆されてきた (Weber, 1964; Saunders, 1966; Hume *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 1991; Tepass *et al.*, 1994)。さらに近年、hyalocyte と呼ばれる組織マクロファージを特異的に欠損させた

¹ 免疫とは、狭い意味では脊椎動物のリンパ球による獲得性免疫のことを指すが、ここでは全ての多細胞動物に普遍的に存在する自然免疫も含めて「免疫機構」と呼んでいる。

transgenic mouse を用いた研究から、眼の発生においてマクロファージが組織の再構成と細胞死に必須であることが示され、マクロファージはアポトーシス細胞を貪食して排除するスカベンジャーとして働く以上に、アポトーシスそれ自体を誘導するという極めて重要な働きを持つことが明らかにされた (Lang & Bishop, 1993; Lang *et al.*, 1994)。この知見は、マクロファージは個体発生にとって不要な組織を「非自己」と認識して積極的に排除することを如実に示しており、「免疫機構は個体発生において自己組織に向けられている」という仮説を強く支持するものとなっている。

では、個体発生過程でマクロファージはどのようにして個体にとって不要な組織を「非自己」として識別して排除するのだろうか？この認識のメカニズムを解明することは、免疫機構が個体の identity を確立する原理を理解するうえで核心となる問題である。しかしながら、個体発生でのマクロファージの自己認識のメカニズムは全く解明されていない。私は、「免疫機構は、個体発生過程で個体の identity を確立するシステムとして進化・発生した」という仮説に立って、免疫機構が個体の identity を確立する原理を知りたいと思った。そこで、発生過程においてマクロファージが不要な自己組織を「非自己」として認識する分子機構を明らかにすることを目標として研究を開始した。

第2節 研究の背景

個体発生の過程でマクロファージが自己の組織や細胞を積極的に「非自己」として認識して排除するという現象は、完全変態昆虫の変態において最も顕著なたちでみられる。完全変態昆虫の変態期には幼虫の組織構築が崩壊して新たに成虫の組織が構築されるが、幾つかの幼虫組織の崩壊はマクロファージ様細胞からなる体液細胞 hemocyte によって担われていることが幾つかの昆虫で示唆されてきた。

例えば、タバコスズメガ *Manduca sexta* では、蛹化初期に体液細胞が筋組織に接着し、接着した部分の基底膜が破壊されるという組織学的な観察がなされている (Rheuben, 1992)。また、Nardi と Miklasz は将来成虫の翅 (wing) を構築する翅原基において、基底膜蛋白に対するモノクローン抗体を用いて詳細な解析をおこない、変態の進行とともに翅原基の基底膜蛋白がそこに接着する体液細胞に移行することから、体液細胞が基底膜の破壊を行っている²と結論している (Nardi & Miklasz, 1989) 。

² 翅原基は将来成虫の翅に発生するという意味で組織全体が排除されることはないが、その発生の際には基底膜が破壊されて幼虫時の組織構築が失われる。ここでは、幼虫時の組織構築が失われるという意味で「幼虫組織の排除」という言葉を用いる。

一方、センチクバエ *Sarcophaga peregrina* では、変態初期における脂肪体の組織崩壊を再現する *in vitro* 系の解析から、体液細胞が脂肪体の崩壊を担うことが示された (Kurata *et al.*, 1989)。脂肪体は脊椎動物における肝臓と腎臓の機能を担う器官であり、蛹化初期に組織崩壊をおこし個々の脂肪細胞が遊離して細胞死を起こす (Lockshin, 1985)。図 1 に示すように、幼虫の脂肪体を蛹化初期の体液細胞とともに *in vitro* で培養すると脂肪体の数珠状の組織構築が破壊されて個々の脂肪細胞が遊離するのに対し、幼虫脂肪体を幼虫体液細胞とともに培養しても脂肪体の崩壊は観察されない。このことから、蛹化初期において体液細胞が脂肪体を破壊する可能性が示され、蛹になると（脂肪体の側ではなく）体液細胞に変化が生じて脂肪体を破壊するようになることが示唆される。さらに、脂肪体と蛹体液細胞を接触できないような条件で共培養しても崩壊が起こらなかったことから、脂肪体の崩壊には体液細胞は細胞表面を介して脂肪体と相互作用することが示された (Kurata *et al.*, 1989)。この現象は、変態に伴って不要幼虫組織に対する体液細胞の認識が「自己」から「非自己」へと転換した結果、組織破壊を行うようになったことを示唆している。

その後の解析から、脂肪体の崩壊は次のような素過程を経て進行することが示された。(1) 蛹体液細胞と脂肪体が接着し (Kurata *et al.*, 1989)、(2) 脂肪体との相互作用の結果、体液細胞からカテプシン B が

分泌され、脂肪体の基底膜が破壊されて脂肪細胞が遊離する (Kurata *et al.*, 1992a, b; Takahashi *et al.*, 1993)。(3) 脂肪細胞は遊離するとアポトーシスを起こす (奥山, 1995)。しかしながら、体液細胞が蛹になるとどのようにして脂肪体に対する認識を転換して排除するようになるのか? という最も根本的な問題は未だ明らかにされていなかった。

ある生命現象の分子機構を解析するためには、解析の容易な *in vitro* 系を用いて必要な因子を同定して行くことが一般に有効な方法である。従って、センチクバエの変態時の幼虫脂肪体の組織崩壊を再現する *in vitro* 系を用いて解析を行うことで、個体発生過程でマクロファージが不要な自己組織を認識して排除する分子機構を普遍的に解明するための手がかりが得られると期待される。また、センチクバエは3齢幼虫の体表を乾燥させることで蛹化をコントロールすることができ (Ohtaki, 1966)、変態過程を生化学、生理学的に解析するのに適した材料である。そこで私は、センチクバエの変態時における幼虫脂肪体の組織崩壊に着目し、蛹体液細胞の幼虫脂肪体に対する認識機構を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を行った。

第3節 本研究の概要

私は、センチクバエの変態期における体液細胞の幼虫組織に対する認識転換機構を明らかにする目的で、図2に示すような作業仮説に立つて研究を行った。すなわち、変態にともなって体液細胞の細胞表面に排除すべき幼虫組織を認識する膜蛋白が新たに発現した結果、体液細胞がその組織を排除の対象として認識するようになるというモデルを考えた。このモデルでは、変態時に排除される組織には「非自己マーカー」が幼虫時からあらかじめ発現しており、体液細胞は蛹化にともなってその「非自己マーカー」を認識する分子を発現するようになるを考える。本研究では、この仮説に従い、変態にともなって体液細胞の細胞表面に発現が誘導される膜蛋白が排除すべき幼虫組織の認識を担うと考え、そのような蛹体液細胞に特異的に発現する膜蛋白の同定と解析を行った。

第2章では、変態にともなって体液細胞の細胞表面に発現が誘導される膜蛋白を同定し解析を行う分子的ツールを得る目的で、蛹体液細胞に対するモノクローン抗体系列を作製した。その結果、幼虫体液細胞とは反応せず蛹体液細胞の細胞表面と特異的に反応するモノクローン抗体を得たことを、そして蛹化初期に分子量 120-kDa の膜蛋白が体液細胞の細胞表面に発現が誘導されることを見出したことを述べる。第2章ではさらに、初期の蛹において 120-kDa 蛋白の発現組織を解析し、120-kDa

蛋白は体液細胞特異的に発現することを明らかにした。第3章では、この 120-kDa 蛋白の一次構造解析を行い、EGF-like repeats を有する新規な膜蛋白であることを明らかにした。以下にその結果を述べる。

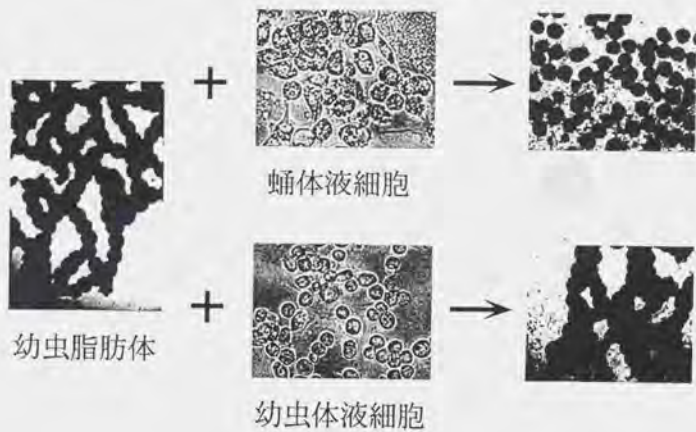


図1 *in vitro*での蛹体液細胞による脂肪体の破壊

蛹体液細胞と脂肪体を *in vitro* で共培養すると脂肪体の数珠状の組織形態が崩壊して個々の脂肪細胞が遊離する。幼虫体液細胞とともに培養してもそのような変化は観察されない。

Hypothetical model of transition
of self-recognition by hemocyte

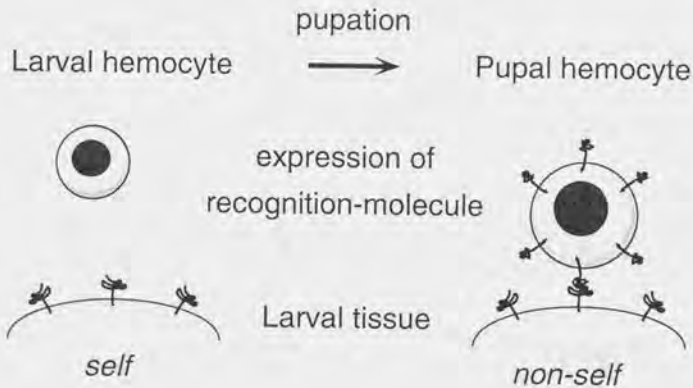


図2 蛹体液細胞の幼虫組織に対する認識転換モデル

蛹化にともなって体液細胞表面に幼虫組織に結合する膜蛋白が新たに発現し、その膜蛋白を介して蛹体液細胞は幼虫組織を「非自己」と認識して排除する。このモデルでは、変態時に排除される組織には「非自己マーカー」が幼虫時からあらかじめ発現しており、体液細胞は蛹化にともなってその「非自己マーカー」を認識するようになると思われる。

第 2 章

変態期に体液細胞表面に発現する

120-kDa 蛋白の同定と性状解析

第1節 序

序論で述べたように、センチニクバエの体液細胞は、蛹化にともなって幼虫脂肪体を排除の対象として認識するように変化する。では、蛹になると体液細胞はどのようなメカニズムで脂肪体を排除の対象として認識するようになるのだろうか。私は、この体液細胞の認識転換を分子レベルで説明する作業仮説として、変態にともなって体液細胞表面に不要幼虫組織を「非自己」として認識する膜蛋白が発現するというモデルを立てた(第1章、図2)。この仮説に立てば、蛹化にともなって体液細胞表面に新たに発現する膜蛋白が不要幼虫組織の認識を担うと考えられる。そこで私は、変態にともなって体液細胞の細胞表面に新たに発現する膜蛋白を同定する目的で実験を行った。

本章では、最初に、変態にともなって体液細胞の細胞表面に新たに発現する膜蛋白を同定し解析を行うための分子的ツールを得る目的で、幼虫体液細胞とは反応せず蛹体液細胞の顆粒細胞表面と特異的に反応するモノクローン抗体を作製し4種のモノクローン抗体を得た。そして、モノクローン抗体の認識する抗原を同定し、蛹化初期に体液細胞の細胞表面に発現が誘導される分子量120-kDaの膜蛋白を見出した。さらに、120-kDa蛋白の発現組織を解析し、体液細胞に特異的に発現し他の組織には発現しないことを明らかにした。

第2節 蛹体液細胞表面と特異的に反応するモノクローン抗体の作製

変態にともなって体液細胞の細胞表面に新たに発現する膜蛋白を同定し解析を行うための分子的ツールを得る目的で、蛹体液細胞に対するモノクローン抗体系列を作製し、幼虫体液細胞とは反応せず蛹体液細胞の細胞表面と特異的に反応するモノクローン抗体を産生するハイブリドーマ株の樹立を行った。

(1) モノクローン抗体を作製する体液細胞の蛹化ステージの検討

センチクバエでは、蛹化にともなって体液細胞画分中に崩壊した筋組織の断片が相当の割合で混入してくる(浦崎, 1994)。幼虫脂肪体の認識を担う蛹体液細胞表面の膜蛋白に対するモノクローン抗体を作製するためには、(1) 崩壊した筋組織の断片を含まない純度の高い体液細胞を用いること、および(2) 脂肪体を崩壊させる活性を有すること(脂肪体を排除の対象として認識すること)、以上の2つの条件を満たした体液細胞を用いる必要がある。そこでまず、抗体を作製する体液細胞の蛹化ステージを検討する目的で、この2つの条件を満たす蛹化ステージの特定をおこなった。

センチクバエは3齢幼虫の体表を乾燥させることにより蛹化をコントロールできるという特徴を持つ (Ohtaki, 1966)。3齢幼虫は体表乾燥後約 16 時間で蛹殻を形成し蛹になるが、乾燥させなければ蛹化は起こらず3齢幼虫の状態が続く。従って、体表乾燥により多くの個体で蛹化を同調させることができ、変態過程を生理学、生化学的に解析するうえで非常に有用な昆虫である。しかし、体表乾燥による同調では個体間で蛹化に数時間のばらつきが生じるので、さらに厳密に蛹化を同調させるために蛹殻形成時の蛹を集めた。この時期の蛹は白蛹と呼ばれ、色と形で蛹化ステージが1時間以内のばらつきで厳密に判断できる。

まず、蛹のどのステージに体液細胞中に崩壊した筋組織の断片が混入してくるかを調べた。白蛹後の時間経過を追って体液細胞を回収し、筋組織のマーカであるミオシン重鎖 (200-kDa 蛋白) に対するマウス・モノクローン抗体 KN-1 (Kurata *et al.*, 1991) を用いてイムノブロット解析を行い、筋組織断片の混入を検出した。その結果、ミオシン重鎖は蛹化後 6 時間までの体液細胞膜画分には検出されず、9 時間になって検出された (図 3)。さらに、KN-1 を用いた間接蛍光抗体法をおこない、体液細胞中で筋組織断片の占める割合を測定した。その結果、KN-1 陽性の筋組織断片は蛹化後 6 時間から出現し始め、9 時間には体液細胞数の約 40% を占めるまでに急激に増加した (data not shown)。以上の結果から、筋組織断片は蛹化後 6 時間後から体液中に混入し始め、その後急激に

増加することが明らかになった。

では、崩壊した筋組織片を含まない蛹化後 6 時間以前の体液細胞は脂肪体を崩壊させる能力を有しているであろうか？そこで次に、白蛹後の時間経過を追って体液細胞を回収し、脂肪体を崩壊させる活性の経時変化を調べた。その結果、白蛹時の体液細胞は脂肪体を崩壊させる活性をわずかに有しており、その活性は蛹化の進行とともに増加してゆくことがわかった（表 1）。この結果は、囲蛹殻形成後の体液細胞は、幼虫脂肪体を破壊の対象として認識することを示している。従って、白蛹期以降の体液細胞には脂肪体の認識を担う分子が発現しており、蛹化の進行とともにその発現量が増加すると考えられる。

以上の結果より、崩壊した筋組織片が混入せず、脂肪体を認識する分子がより多く発現していると予想される、蛹化後 4-5 時間の蛹体液細胞に対してモノクローン抗体を作製することにした。

(2) 蛹体液細胞表面と特異的に反応するモノクローン抗体の作製

蛹化後 4-5 時間の蛹体液細胞に対してモノクローン抗体の作製を行った。

方法は、蛹化後 4-5 時間の蛹体液細胞を生きたままアジュバントを用いずに Balb/c マウスに免疫した。幼虫体液細胞には発現せず蛹体液細胞に特異的に発現する抗原に対するモノクローン抗体をより多く得るために、Barclay & Smith (1986) の方法に従って追加免疫を行った。すなわち、幼虫体液細胞を免疫した別のマウスから抗血清を調製し、蛹体液細胞とともに追加免疫した。この操作により、幼虫と蛹体液細胞両者に共通に存在する抗原が抗血清中の抗体によってマスクされ、蛹特異的に発現する抗原に対する抗体が作られ易くなると期待される。そして、最終免疫の 4 日後にマウスから脾細胞を調製し、マウス・ミエローマ細胞と細胞融合をおこなってハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマは、固定条件での体液細胞の間接蛍光抗体法および体液細胞膜成分の dot-blot を独立におこなって、幼虫体液細胞と比較して蛹体液細胞と選択的に反応することを指標にスクリーニングし、限界希釈法によりクローン化した。

その結果、間接蛍光抗体法で陽性であった 23 クローン、dot-blot で陽性であった 3 クローンの計 23 クローンを樹立した。dot-blot で陽性

であった3クローンは間接蛍光抗体法でも陽性であった。

次に、これら23クローンのなかから、解析を進めるクローンを選択する目的で、非固定条件の生きた体液細胞を用いて間接蛍光抗体法を行い、蛹体液細胞の細胞表面と反応し、幼虫体液細胞表面とは反応しないモノクローン抗体をスクリーニングした。

その結果、4種のモノクローン抗体1E3、4D4、9C8、9F3を選別した。そして、それぞれのモノクローン抗体のisotypeを決定した(表2)。その他の抗体は、体液細胞表面と全く反応しないか、反応しても蛹体液細胞との特異的な反応性が見られないかのいずれかであった。

得られた4種の抗体を用いて非固定条件の生きた体液細胞を用いて間接蛍光抗体法を行った結果を図4に示す。4種の抗体はいずれも蛹体液細胞の細胞表面と反応するのに対し、幼虫体液細胞とは有為な反応を示さなかった。さらに、これら4種の抗体は全て、蛹体液細胞のなかでも顆粒を多く含んだ細胞とのみ強く反応し、他の形態の細胞とは反応しないことがわかった。昆虫の体液細胞は一般に、顆粒細胞、プラズマ細胞、小球細胞、エノシトイド、原白血球の主に5種類の細胞種からなるヘテロな細胞集団である(Gupta, 1985)。得られた4種のモノクローン抗体と反応する細胞は、顆粒を多く含むという形態的特徴から、顆粒細胞であると考えられる。

以上の結果から、幼虫体液細胞とは反応せず、蛹体液細胞の細胞表面

と特異的に反応する4種のモノクローンが得られたことがわかった。

第3節 蛹化に伴って体液細胞に発現する 120-kDa 蛋白の同定

蛹化に伴って体液細胞表面に発現する膜蛋白を同定する目的で、得られたモノクローン抗体を用いてその認識抗原の同定をおこなった。

(1) イムノプロット法によるモノクローン抗体の認識抗原の同定

まず、幼虫および蛹体液細胞蛋白のイムノプロット解析を行い、モノクローン抗体の認識抗原を同定した。結果を図5に示す。

9C8 抗体を用いた場合、蛹体液細胞特異的に分子量 120-kDa のバンドが検出された。一方、幼虫体液細胞ではシグナルは検出されなかった。

また、9F3 抗体を用いた場合、9C8 抗体と同じ移動度の蛹特異的な分子量 120-kDa のバンドの他に、幼虫と蛹両者に 200-kDa 以上および 43-kDa 以下の 2 つのバンドが検出された。先の間接蛍光抗体法の結果は 9F3 抗体は幼虫体液細胞表面とは反応しないことを示している。従って蛹特異的な 120-kDa の蛋白が細胞表面に存在する分子であり、幼虫と蛹両者に検出された 2 つのバンドは細胞内に存在し、120-kDa の蛋白と共通抗原性を示す別の蛋白質であると考えられる。

一方、1E3 および 4D4 抗体を用いた場合シグナルは検出されなかった。

これは、SDS-PAGE を行う際に蛋白を SDS と 2-mercaptoethanol 存在下で変性させたために、これらの抗体の認識するエピトープが破壊されたためと思われる。

(2) 免疫沈降法によるモノクローン抗体の認識抗原の同定

次に、イムノプロットではシグナルが検出されなかった 1E3 および 4D4 抗体についてその認識抗原を明らかにするために、免疫沈降をおこなった。認識抗原は膜蛋白であると考えられるので、蛹体液細胞を 1% NP40 により可溶化してその lysate を用いた。免疫沈降物の SDS-PAGE を行い、銀染色により解析したところ、1E3、4D4、9C8 抗体を用いた場合、同一移動度の分子量 120-kDa の位置にバンドが検出された。9F3 抗体を用いた場合は、シグナルは検出されなかった (図 6A)。9F3 抗体は、主に一次免疫応答に誘導される IgM であることからアフィニティーが弱いと考えられる。そしてアフィニティーが弱いために、イムノプロット法と比べて局所的な抗原濃度の低い条件で抗原抗体反応を行う免疫沈降法では抗原と十分に結合できないためにシグナルが検出されなかったと考えられる。

次に、4 種の抗体の認識する蛋白質が同一の分子量を示したことから、

抗体の認識する抗原が同一の蛋白である可能性が考えられる。そこで次に、1E3、4D4、9C8 抗体を用いて免疫沈降をおこなったのち、その免疫沈降物を 9F3 抗体を用いてイムノプロットにより解析した。その結果、各抗体で免疫沈降された 120-kDa の蛋白はすべて 9F3 抗体と反応し、その分子量は lysate 中の 120-kDa 蛋白と同一の移動度を示した (図 6B)。対照として、コントロール IgM (Zymed) を用いてイムノプロットを行った場合、120-kDa のシグナルは検出されなかった (data not shown)。また、同じ免疫沈降物を 9C8 抗体を用いてイムノプロットにより解析した場合も、9F3 抗体と同様の結果を示した (data not shown)。従って、4 種の抗体の認識する抗体は全て同一であり、蛹化にともなって体液細胞表面に発現する 120-kDa 蛋白であることが明らかになった。

以上の結果、4 種のモノクローン抗体の認識する抗原は全て同一で分子量 120-kDa の蛋白質であり、120-kDa 蛋白は変態期に体液細胞で新たに発現する蛋白であることが明らかになった。

第4節 蛹化に伴う 120-kDa 蛋白の発現量の変動

次に、120-kDa 蛋白の発現と幼虫組織の組織崩壊との時間的相関関係を調べる目的で、蛹化にともなう 120-kDa 蛋白の発現量の変動を解析した。仮に、この 120-kDa 蛋白が幼虫脂肪体の認識を担う実体であるならば、この蛋白の発現は幼虫組織の崩壊に先立って発現すると予想される。そこで、蛹化の時間経過を体液細胞を回収し、120-kDa 蛋白の発現量の変動を 9C8 抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

その結果、120-kDa 蛋白は囲蛹殻形成時（白蛹期）にすでに発現し、その後は蛹化後 4 時間にかけて増加し、8 時間ではやや減少することがわかった（図 7）。蛹化後 8 時間で 120-kDa 蛋白の発現量がやや減少しているのは、この時期の体液細胞には崩壊した筋組織の断片が混入しているために全蛋白に対する 120-kDa 蛋白の相対的な量が見かけ上減少したためと考えられる。

筋組織は蛹化後約 6 時間（第 2 節参照）、脂肪体は約 24 時間で崩壊する。従って 120-kDa 蛋白の発現はこれら幼虫組織の崩壊に先立って発現することがわかった。

さらに、白蛹期の体液細胞においては 120-kDa のバンドの他に、130-kDa の位置にもバンドが検出され、そのバンドは蛹化にともなって消失することがわかった（図 7）。この 130-kDa のバンドは、9C8 抗体

のみならず他の3種の抗体によっても認識された (data not shown)。4種の抗体はエピトープが異なると考えられることから、この130-kDaのバンドは120-kDa 蛋白と共通抗原性を示す別の蛋白質に由来するのではなく、リン酸化や糖鎖付加などの120-kDa 蛋白の修飾に起因すると考えられる。

第5節 120-kDa 蛋白の発現組織の解析

これまでの結果から、120-kDa 蛋白が蛹化にともない体液細胞に新たに発現することがわかった。そこで次に、120-kDa 蛋白は初期の蛹において体液細胞に特異的に発現する分子であるのか、それとも他の組織にも発現する普遍的な変態のマーカー分子であるのかを検討した。

蛹化後4から5時間の蛹から体液細胞、脂肪体、筋肉、肢原基、脳および眼原基、体液の各組織を摘出し、9C8抗体を用いたイムノプロットを行ってそれぞれの組織における120-kDa 蛋白の発現を検出した。

その結果、体液細胞にのみ120-kDa 蛋白のシグナルが検出された(図8)。このことから、120-kDa 蛋白は単なる変態のマーカー分子ではなく、体液細胞に特異的に発現し、その機能と密接に関係した蛋白質であると考えられる。

第6節 考察

本章では、蛹体液細胞に対するモノクローン抗体を作製し、幼虫体液細胞とは反応せず蛹体液細胞の細胞表面と特異的に反応する4種のモノクローン抗体を得たことを示した。そして、4種のモノクローン抗体は全て分子量120-kDaの同一の蛋白質を認識し、この120-kDa蛋白質は蛹化初期に幼虫組織の崩壊に先だって発現することを示した。さらに、120-kDa蛋白質は体液細胞のなかでも顆粒細胞と呼ばれる細胞種に特異的に発現し、他の細胞、組織には発現しないことを明らかにした。

これまでに幾つかの昆虫で、幼虫の体液細胞表面と反応し異なる細胞種を識別するモノクローン抗体を作製した報告があるが(Chain *et al.*, 1992; Mullett *et al.*, 1993; Willott *et al.*, 1994)、蛹体液細胞表面を特異的に認識するモノクローン抗体を作製し、蛹化にともなって体液細胞表面に特異的に発現する膜蛋白を見出したのは本研究が初めてである。

先に倉田らは、蛹体液細胞に対するモノクローン抗体を作製して分子量200-kDaの蛋白質が蛹化にともなって体液細胞に発現することを見出した(Kurata *et al.*, 1991)。しかしながら、cDNAクローニングの結果この200-kDa蛋白質はミオシン重鎖であり、体液細胞ではなく崩壊した筋組織に由来することが示された(浦崎, 1994)。そこで本章第2節では、この筋組織片の混入が蛹のどの時期に始まるのかを詳細に調べ、筋組織

片の混入のない蛹化後 4-5 時間の蛹の体液細胞に対してモノクローン抗体を作製した。

倉田らはさらに、この 200-kDa 蛋白を特異的に認識するモノクローン抗体または精製 200-kDa 蛋白が *in vitro* で脂肪体の崩壊を阻害することを示し、この蛋白質が幼虫脂肪体の認識過程に関与することを示唆した (Kurata *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.* 1991)。しかしながら、今回私は崩壊した筋組織が存在しない時期の蛹体液細胞を用いても脂肪体を崩壊させることを示し、体液細胞による脂肪体の認識には 200-kDa 蛋白が必須ではないことを初めて明らかにした。

今回得られたモノクローン抗体は、蛹体液細胞のなかでも顆粒細胞と特異的に反応した。この蛹顆粒細胞は、脂肪体を崩壊させる実働分子であるカテプシン B を発現し、脂肪体との相互作用により細胞外に分泌することが明らかにされている (Kurata *et al.*, 1992, 1993)。一方、タバコスズメガ *Manduca* では、顆粒細胞は筋組織 (Rheuben, 1992) や翅原基 (Nardi and Miklasz, 1989) に接着してその基底膜を破壊して貪食するという知見が得られている。これらの知見を総合すると、120-kDa 蛋白は顆粒細胞とこれらの幼虫組織との相互作用に機能している可能性が考えられる。

一方、体液細胞は崩壊した幼虫組織の断片やアポトーシス細胞を貪食して排除することが知られているが、それを行うのは顆粒細胞

ではなく多核化した特殊な細胞であることが形態観察から示されている (Whitten, 1964)。従って、120-kDa 蛋白は幼虫組織の断片やアポトーシス細胞を貪食するレセプターとして機能するものではないと考えられる。

幼虫組織の組織崩壊は蛹化後急速に進行し、第2節で述べたように蛹化後6時間には筋組織が崩壊してその断片が体液中に出現する。一方脂肪体は、蛹化後徐々に基底膜を構成する蛋白が分解され10時間後にはその蛋白が消失し (Kobayashi *et al.*, 1995)、24時間後には組織が崩壊して脂肪細胞が遊離する。120-kDa 蛋白の発現はこれらの幼虫組織の崩壊に先立っており、崩壊過程と時間的に強く相関して発現していることから、120-kDa 蛋白の幼虫組織の組織崩壊過程への関与が強く示唆される。

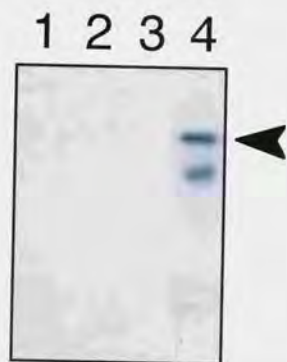


図3 蛹化にともなう体液細胞画分中 200-kDa 蛋白の変動

蛹化後の時間経過を追って体液細胞を回収し、混入する崩壊筋組織片を検出した。ミオシン重鎖 (200-kDa 蛋白) を特異的に認識するモノクローン抗体 KN-1 を用いて各ステージの体液細胞膜画分のイムノブロット解析を行い、ミオシン重鎖の変動を解析した。各レーン 30 μg の膜画分を泳動している。但し、蛹化後 9 時間は 1 μg 。Lane 1 : 蛹化後 0 時間、Lane 2 : 3 時間、Lane 3 : 6 時間、Lane 4 : 9 時間。矢印で 200-kDa 蛋白の位置を示す。

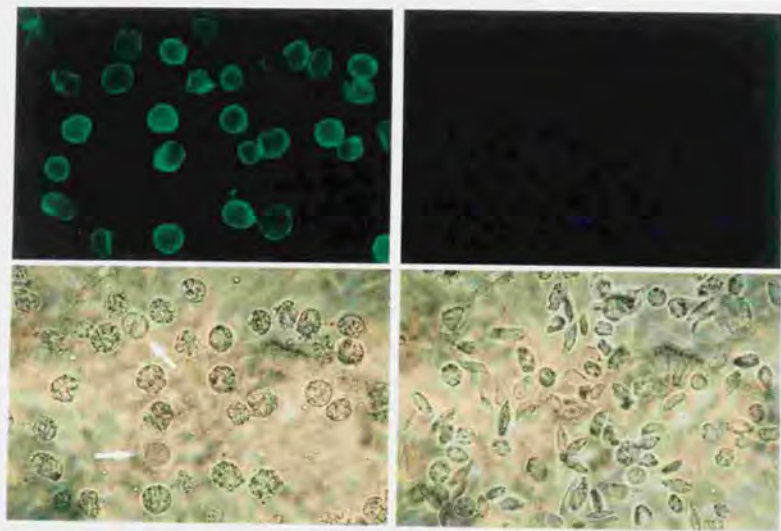


図 4 (A) 1E3 抗体を用いた生体液細胞の間接蛍光抗体法

3 齢幼虫および蛹化後 4-5 時間の蛹から体液細胞を回収し、ハイブリドーマ培養上清と反応を行い、結合したモノクローン抗体を FITC 標識 2 次抗体により検出した。左のパネルは蛹体液細胞、右は幼虫体液細胞、上は免疫蛍光像、下はその明視野像。

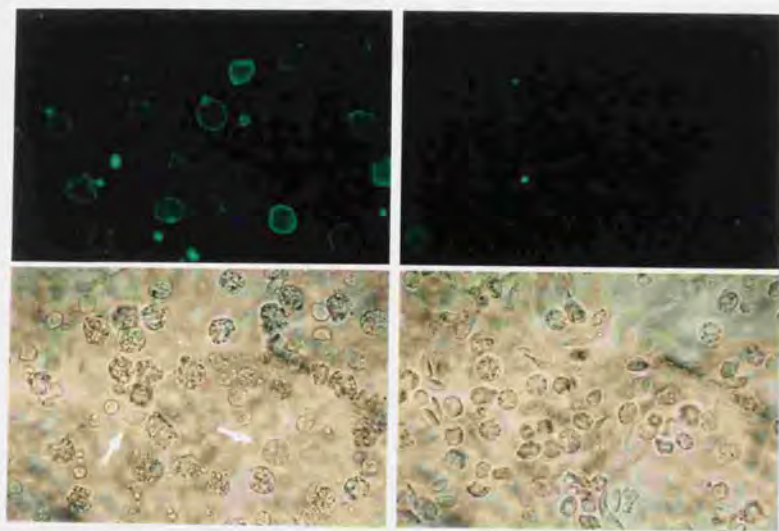


図 4 (B) 4D4 抗体を用いた生体液細胞の間接蛍光抗体法

3 齢幼虫および蛹化後 4-5 時間の蛹から体液細胞を回収し、ハイブリドーマ培養上清と反応を行い、結合したモノクローン抗体を FITC 標識 2 次抗体により検出した。左のパネルは蛹体液細胞、右は幼虫体液細胞、上は免疫蛍光像、下はその明視野像。

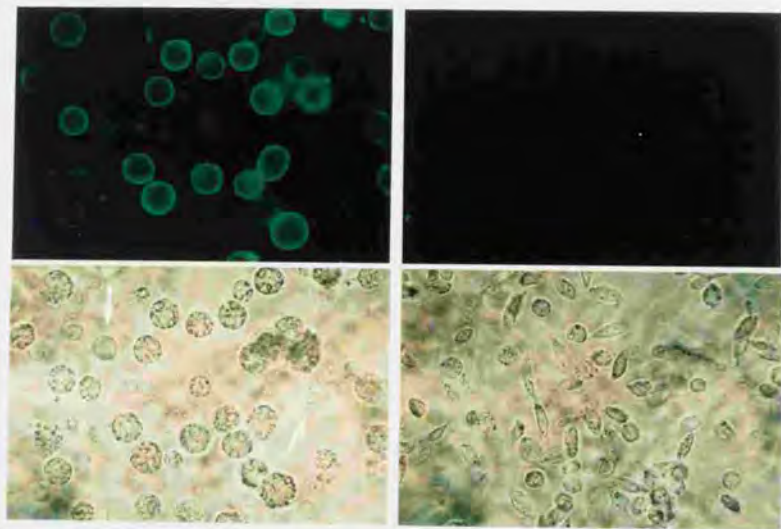


図 4 (C) 9C8 抗体を用いた生体液細胞の間接蛍光抗体法

3 齢幼虫および蛹化後 4-5 時間の蛹から体液細胞を回収し、ハイブリドーマ培養上清と反応を行い、結合したモノクローン抗体を FITC 標識 2 次抗体により検出した。左のパネルは蛹体液細胞、右は幼虫体液細胞、上は免疫蛍光像、下はその明視野像。

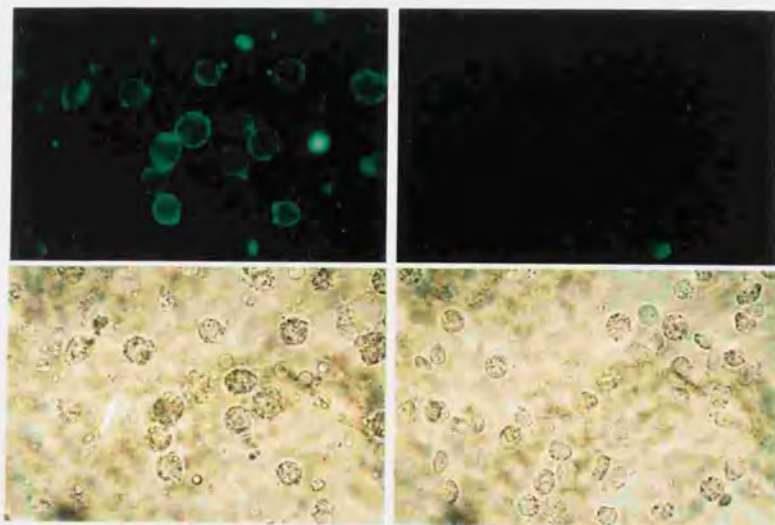


図 4 (D) 9F3 抗体を用いた生体液細胞の間接蛍光抗体法

3 齢幼虫および蛹化後 4-5 時間の蛹から体液細胞を回収し、ハイブリドーマ培養上清と反応を行い、結合したモノクローン抗体を FITC 標識 2 次抗体により検出した。左のパネルは蛹体液細胞、右は幼虫体液細胞、上は免疫蛍光像、下はその明視野像。

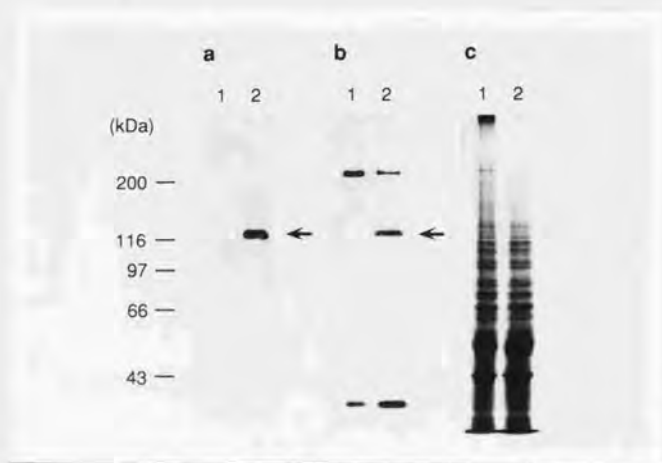


図5 9C8 および9F3 抗体を用いた体液細胞蛋白のイムノプロット解析

用いたモノクローン抗体は、a: MAb 9C8、b: 9F3。cは用いた体液細胞蛋白のCBB染色像。各レーン、a: 60 μ g、b: 15 μ g、c: 30 μ gの体液細胞蛋白を泳動している。Lane 1: 3 齢幼虫体液細胞蛋白、Lane 2: 蛹化後4-5時間の蛹体液細胞蛋白。矢印で蛹特異的な120-kDa蛋白の位置を示している。

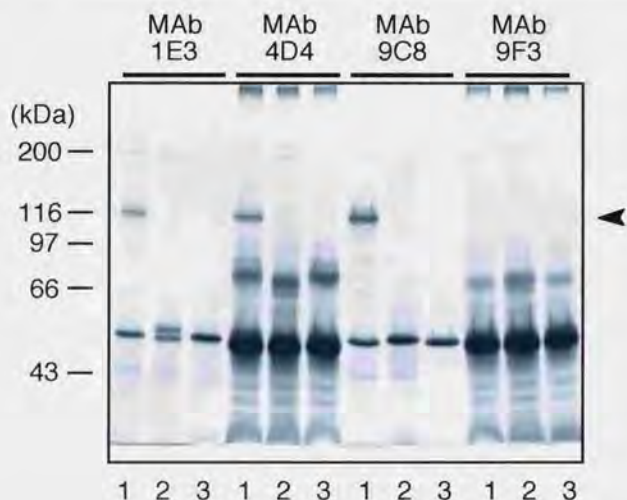


図6 モノクローン抗体を用いた蛹体液細胞 lysate の免疫沈降解析

(A) 免疫沈降物の SDS-PAGE/銀染色による解析

蛹化後 4-5 時間の蛹体液細胞を 1% NP40 により可溶化し、モノクローン抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を SDS-PAGE (7%) により分離し、銀染色により解析した。図中横線で免疫沈降に用いたモノクローン抗体を示す。各抗体について、Lane 1: モノクローン抗体を用いた免疫沈降物、Lane 2: サブクラス的一致した陰性コントロール抗体、Lane 3: lysate を用いずに同様の操作を行ったバックグラウンド。矢印はモノクローン抗体によって特異的に沈降される分子量 120-kDa のバンドを示す。

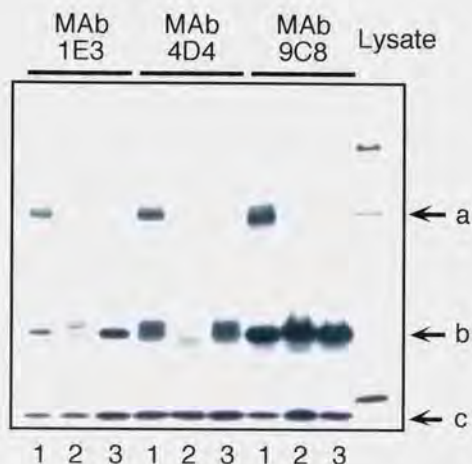


図6 モノクローン抗体を用いた蛹体液細胞 lysate の免疫沈降解析

(B) 免疫沈降物の 9F3 抗体を用いたイムノプロット解析

蛹化後 4-5 時間の蛹体液細胞を 1% NP40 により可溶化し、モノクローン抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を SDS-PAGE (7%) により分離した後、9F3 抗体を用いてイムノプロットにより解析した。図中横線で免疫沈降に用いたモノクローン抗体を示す。各抗体について、Lane 1 : モノクローン抗体を用いた免疫沈降物、Lane 2 : サブクラス的一致した陰性コントロール抗体、Lane 3 : lysate を用いずに同様の操作を行ったバックグラウンド。右端のレーン (Lysate) は、用いた蛹体液細胞 lysate を泳動したレーン。矢印は、a: 120-kDa 蛋白、b: Ig heavy chain、c: Ig light chain。



図7 体液細胞における蛹化にともなう 120-kDa 蛋白の発現変動

蛹化後の時間経過を追って体液細胞を回収し、9C8 抗体を用いてイムノブロット解析を行って 120-kDa 蛋白を検出した。各レーン 60 μ g の体液細胞蛋白を泳動している。Lane 1 : 3 齢幼虫、Lane 2 : 蛹化後 0 時間、Lane 3 : 4 時間、Lane 4 : 8 時間。黒の矢印で 120-kDa 蛋白、白の矢印で 130-kDa 蛋白の位置を示す。

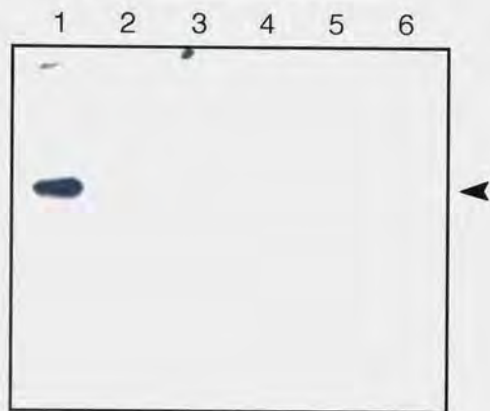


図8 120-kDa 蛋白の発現組織の解析

蛹化後 4-5 時間の蛹から各組織を摘出し、その全蛋白を 9C8 抗体を用いたイムノプロットにより解析した。各レーン 100 μg の蛋白を泳動している。Lane 1 : 体液細胞、Lane 2 : 脂肪体、Lane 3 : 筋組織、Lane 4 : 肢原基、Lane 5 : 脳および眼原基、Lane 6 : 体液。

Experiment	Stage of hemocyte isolation (time after pupariation)			hemocyte (-)
	0 h	3 h	6 h	
NO. 1	N.T.	2 %	63 %	0 %
		26 %	45 %	0 %
			39 %	
No. 2	N.T.	70 %	N.T.	0 %
		26 %		0 %
No. 3	1 %	22 %	N.T.	0 %
	6 %	7 %		0 %
	6 %			0 %

表1 蛹化にともなう体液細胞の脂肪体崩壊活性の変化

蛹化後の時間経過を追って体液細胞を回収して脂肪体と 24 時間共培養し、脂肪体の崩壊率を測定した。Experiment No.は独立の実験を表し、数値 (%) は各 well の脂肪体崩壊率を示す。N.T.: not tested。

	subclass	light chain
MAb 1E3	IgG1	κ
MAb 4D4	IgM	κ
MAb 9C8	IgG2a	κ
MAb 9F3	IgM	κ

表2 モノクローン抗体の isotype

第 3 章

120-kDa 蛋白の一次構造解析

第1節 序

前章で、変態期に体液細胞表面に発現が誘導される分子量 120-kDa の膜蛋白を同定し、この蛋白が初期蛹において顆粒細胞に特異的に発現することを示した。

この蛋白が、変態期において幼虫組織の認識を担う分子であることを示し、マクロファージが個体発生過程で自己組織を「非自己」と認識する分子機構を種を越えて解明するためには、最終的にはこの分子の一次構造を明らかにすることが必須である。すなわち、120-kDa 蛋白の一次構造を明らかにすることで他種ホモログの単離が可能になり、ショウジョウバエやマウスを用いて knockout mutant や overexpression mutant を作製してこの分子の機能を解明できると期待される。

本章では、120-kDa 蛋白の一次構造解析を行った。最初に、9C8 抗体を用いて 120-kDa 蛋白のアフィニティー精製を行い、得られた精製 120-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列を決定した。そして、得られた部分アミノ酸配列をもとに 120-kDa 蛋白の cDNA クローニングを行った。その結果、120-kDa 蛋白は細胞外領域にタンデムにつながった 17 個（不完全なものまで含めると 18 個）の EGF-like repeat を有する新規な I 型膜蛋白であることが明らかになった。最後に、一次構造から想定される 120-kDa 蛋白の機能について考察する。

第2節 120-kDa 蛋白の精製

120-kDa 蛋白の cDNA クローニングを行うためには、まずその部分アミノ酸配列に関する情報を得ることが必要である。そこで、部分アミノ酸配列を決定する目的で、120-kDa 蛋白の精製を行った。

前章の結果から蛹化後約 0-6 時間の蛹には 120-kDa 蛋白がほぼ一定量発現することが明らかになったので、体液細胞の蛹化時期には厳密にはこだわらず、蛹化後約 2-6 時間の蛹体液細胞を精製のソースとして用いた。まず蛹体液細胞を種々の protease inhibitor 存在下で 1% NP40 により可溶化し、遠心により debris を除いた。そして、9C8 抗体を用いて作製した抗体カラムに得られた lysate を添加した。そして、1M NaCl にて非特異的に吸着した蛋白を十分洗浄したのち、100mM glycine-HCl, pH2.5 を用いて酸性条件で結合した蛋白を溶出し分画した。その後、各画分の SDS-PAGE を行い、分子量が 120-kDa の蛋白質を含む画分をプールした。

その結果、SDS-PAGE 上、major なバンドとして分子量 120-kDa の蛋白質が得られた。また minor なバンドとして 130-kDa の蛋白も得られた。そして、それらの蛋白質は 9C8 抗体により免疫沈降された (図 9)。以上の結果から、9C8 抗体の認識する抗原である 120-kDa 蛋白および 130-kDa 蛋白が精製されたと結論した。

第3節 120-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列の決定

精製した 120-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列および N 末端アミノ酸配列を決定した。

精製 120-kDa 蛋白を SDS-PAGE により分離した後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写して 120-kDa 蛋白を切り出した。得られた 120-kDa 蛋白はフィルターごと endopeptidase Lys-C により消化し、逆相 (C18) カラム HPLC によりペプチド断片を分離・精製した。そして HPLC 上明瞭なピークを与えたペプチドについて、ペプチド・シークエンサーを用いエドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。N 末端アミノ酸配列は、得られた精製 120-kDa 蛋白を SDS-PAGE により分離した後、PVDF 膜に電氣的に転写して 120-kDa 蛋白を切り出し、ペプチド・シークエンサーによりアミノ酸配列を決定した。

その結果、4つのペプチド断片の部分アミノ酸配列と N 末端アミノ酸配列を決定した (表 3)。

また、130-kDa 蛋白の N 末端アミノ酸配列も同様にして決定したところ、その配列は決定できた 20 残基にわたって 120-kDa 蛋白の N 末端アミノ酸配列と一致した (表 3)。このことから、130-kDa 蛋白は 120-kDa 蛋白にリン酸化や糖鎖付加などによるなんらかの修飾が加わった修飾体であると考えられる。

第4節 120-kDa 蛋白の cDNA クローニング

120-kDa 蛋白の全一次構造を決定する目的で、cDNA クローニングを行った。

まず、白蛹体液細胞から total RNA を調製し、cDNA ライブラリーを構築した。その結果、 2.2×10^6 個の独立のクローンからなる cDNA ライブラリーが構築された。

120-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列より予想される核酸配列をプライマーにして、蛹体液細胞 total RNA に対して RT-PCR を行って 120-kDa 蛋白の cDNA 断片を増幅した。決定した部分アミノ酸配列全てについてセンス・プライマーおよびアンチセンス・プライマーを作製し、全ての組み合わせについて RT-PCR を行った。そのうちのいくつか組み合わせについて増幅産物が検出されたが、N 末端アミノ酸配列から設計したセンス・プライマーと、ペプチド 31 から設計したアンチセンス・プライマーを用いて増幅された 480 bp の産物について TA クローニングによりサブクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、得られたサブクローンは決定した N 末端とペプチド 31 のアミノ酸配列をコードすることがわかった。そこで、得られたサブクローンをプローブとして蛹体液細胞 cDNA ライブラリーより cDNA クローンを単離した。

図 10 に単離した cDNA の核酸配列と、予想されるアミノ酸配列を示

す。単離して塩基配列を決定した cDNA クローンの insert 長は 2,829bp であり、765 個のアミノ酸からなる open reading frame を有していた。予想されるアミノ酸配列には、精製蛋白から決定した部分アミノ酸配列が全て含まれていた。また、決定した部分アミノ酸配列の 1 残基前のアミノ酸が lysine であったことも、これらの部分アミノ酸配列が単離したクローン由来であることを支持する。以上の結果から、単離した cDNA クローンが 120-kDa 蛋白をコードする cDNA であることが明らかになった。

120-kDa 蛋白は細胞表面に存在する膜蛋白であると予想される。図 11 に 120-kDa 蛋白の hydrophathy profile を示すが、予想アミノ酸配列の N 末端および 700 番目のアミノ酸付近に疎水性の高い領域が認められた。さらに、蛋白質のソーティング・シグナルを予測するコンピュータ・プログラム PSORT によって、120-kDa 蛋白の細胞内局在を予測した。その結果、first methionine から 18 残基がシグナル配列、702 番目から 718 番目のアミノ酸の 17 残基が膜貫通領域と予測され、120-kDa 蛋白は I 型膜蛋白であることが明らかになった (図 10)。

さらに、予想アミノ酸配列には、糖鎖付加可能部位が 8 個存在していた。予想アミノ酸配列から予想される分子量は 82-kDa であり、SDS-PAGE 上の分子量 120-kDa とは異なることから考えて、120-kDa 蛋白は糖鎖による修飾を受けているものと考えられる。

第5節 120-kDa 蛋白の構造的特徴

前節で決定した 120-kDa 蛋白が既知の分子のホモログであるのか、それとも、新規な構造を有した蛋白質であるのかを調べる目的で、120-kDa 蛋白の予想アミノ酸配列に関して蛋白質データベース SwissProt に対してホモロジー検索を行った。

その結果、高い相同性を示す蛋白質は見出されなかったが、fibrillin、tenascin などの細胞外マトリクス蛋白、Delta、Notch、LDL receptor related protein などの膜蛋白、EGF などの分泌蛋白といった EGF-like repeat を有する蛋白群と相同性を示した (Maslen *et al.*, 1991; Pearson *et al.*, 1988; Vaessin *et al.*, 1987; Wharton *et al.*, 1985)。そこで、120-kDa 蛋白の予想アミノ酸配列中に EGF-like repeat が存在するか検討したところ、細胞外領域にその繰り返し構造が見出された。図 12 に 120-kDa 蛋白の予想アミノ酸配列に見出される繰り返し構造を示し、50%以上のリピートで保存されているアミノ酸をコンセンサス配列として示す。また、図 13 に 120-kDa 蛋白のコンセンサス配列と他の蛋白の EGF-like repeat のコンセンサス配列を示す。120-kDa 蛋白の繰り返し構造中には、EGF-like repeat に保存されている 6 つの cysteine 残基が全て存在し、また他の蛋白でも比較的保存されているアミノ酸も存在した。以上の結果から、120-kDa 蛋白に見出される繰り返し構造は

EGF-like repeat であると結論した。また、EGF-like repeat はそのアミノ酸配列から、calcium-binding type と non-calcium binding type の 2 つのタイプに分類される。120-kDa 蛋白に存在する EGF-like repeat は全て non-calcium binding type であった。

全体の構造を模式的に示すと、120-kDa 蛋白は N 末端側細胞外領域にタンデムにつながった EGF-like repeat を 17 個、不完全なものまで含めると 18 個有し、膜貫通領域を挟んで 47 アミノ酸と比較的短い細胞内領域をもつ膜蛋白であることが明らかになった (図 14)。なお、細胞内領域には高い相同性を示す蛋白および機能ドメインは見出されなかった。以上の結果から、120-kDa 蛋白は EGF-like repeat を有する新規な I 型膜蛋白であることが明らかになった。

第6節 考察

本章において私は、120-kDa 蛋白の全一次構造を決定し、120-kDa 蛋白が細胞外領域にタンデムにつながった 17 個（不完全なものまで含めると 18 個）の EGF-like repeat を有する新規な I 型膜蛋白であることを明らかにした。

EGF-like repeat を有する蛋白質は、Notch、Delta、LDL receptor、C1q receptor (C1qRp) といった膜蛋白、tenascin、fibrillin、laminin といった細胞外マトリクス蛋白、EGF、tissue plasminogen activator といった分泌性蛋白など、多くの蛋白が知られている。そして、それらの蛋白の機能も多岐にわたっており、EGF-like repeat を有するという構造的特徴のみから 120-kDa 蛋白の機能を議論することはできない (Appella *et al.*, 1988)。しかし、120-kDa 蛋白は (1) 昆虫の変態という発生過程に特異的に発現する、(2) 体液細胞（顆粒細胞）に特異的に発現する、という特徴を持っており、この 2 つの側面で EGF-like repeat を有する他の蛋白と比較して 120-kDa 蛋白の機能に関して議論してみたい。

(1) 発生過程に特異的に発現する EGF-like repeat を有する分子との比較。

120-kDa 蛋白は蛹化の初期に発現が誘導されることから、発生過程に機能する分子であると考えられる。発生過程において機能する EGF-like repeat を有した蛋白質としては、ショウジョウバエの Notch, Delta が知られており、初期発生において neuroblast (神経幹細胞) が神経上皮から分化する際にレセプターとリガンドの関係として細胞・細胞間相互作用に機能し、細胞の運命決定を制御することが示されている (Wharton *et al.*, 1985; Vaessin *et al.*, 1987; Artavanis-Tsakonas, *et al.*, 1995)。この Notch, Delta は、線虫 (*C. elegance*) から哺乳類までホモログが存在し、同様に発生過程の様々な局面で細胞の運命決定を担うことが明らかにされている (Artavanis-Tsakonas, *et al.*, 1995)。一方、細胞外マトリクスである tenascin は脊椎動物の胚発生過程や再生過程など時期特異的に限られた組織で発現し、プロテアーゼの分泌や軸索の伸展など細胞によって様々な応答を引き起こす (Werb *et al.*, 1990; Wehrle and Chiquet, 1990)。

120-kDa 蛋白がこのような機能を有する分子と相同性を示すということは、120-kDa 蛋白が顆粒細胞と他の組織の細胞あるいは基質との相互作用に機能する分子である可能性を示唆する。具体的には、前章までに述べてきたように、蛹顆粒細胞が脂肪体、筋組織、成虫原基などの組

織に接着しプロテアーゼを分泌してその基底膜を破壊する際に、120-kDa 蛋白はこれらの組織を認識し細胞内にシグナルを伝達する機能を担うという可能性が考えられる。もしくは、120-kDa 蛋白は脂肪体や筋組織などの細胞のアポトーシスを誘導したり、成虫原基の未分化な細胞の分化を誘導するといった、標的組織の細胞に情報を伝達するリガンドである可能性も考えられる。

(2) 免疫細胞に発現する EGF-like repeat を有する分子との比較

120-kDa 蛋白は体液細胞に特異的に発現し、他の組織には発現しないことから、体液細胞の機能と密接に関連した蛋白質であると考えられる。マクロファージなどの免疫細胞の細胞表面に発現する EGF-like repeat を有する膜蛋白としては、LDL receptor、LRP (LDL receptor related protein)、C1qRp、selectin が知られているがその例はわずかである。

このうち LDL receptor と LRP は構造的に関連しており、細胞外領域には EGF-like repeat の他に LDL receptor ligand-binding repeat を有しており、これらのリピートが交互に並んでいる。また、細胞内領域には endocytosis を行うレセプターに共通して存在する "NPXY-motif" と呼ばれる配列が存在しており、実際に LDL などのリポ蛋白のみならず多様なリガンドを結合して endocytosis を行う機能を持つことが知られ

ている (Krieger and Herz, 1994)。

また、C1qRp は補体の成分である C1q の他、MBL (mannose-binding lectin)、SPA (surfactant protein A) を結合するレセプターであり、初期免疫応答においてマクロファージや好中球などの食細胞がこれらの蛋白によってオプソニン化された異物を貪食するレセプターとして機能していると考えられている。この蛋白は、5 つの EGF-like repeat の他に C-type lectin domain を有している (Nepomuceno *et al.*, 1997)。

EGF-like repeat がこれらの endocytosis を行うレセプターに存在していることから、120-kDa 蛋白も endocytosis に関わる可能性が考えられる。特に蛹化時には、幼虫組織の組織崩壊が急激に進行することから、120-kDa 蛋白が崩壊した幼虫組織の断片やアポトーシス細胞の貪食に機能するのではないかと考えられる。しかし、120-kDa 蛋白の細胞外ドメインは EGF-like repeat のみからなり、LRP や C1qRp に見られる他のドメイン構造を持っていないことから、これらの分子のサブファミリーに属するとは考え難い。また、マクロファージが発生過程で生じたアポトーシス細胞や老化した細胞を貪食するレセプターとしては、vitronectin receptor (Savill *et al.*, 1990; Fadok *et al.*, 1992) と phosphatidylserine receptor (Fadok *et al.*, 1992)、scavenger receptor (Krieger and Herz, 1994; Pearson *et al.*, 1995)、CD36 superfamily (Franc *et al.*, 1996) など多くの分子が知られているが、120-kDa 蛋白は

いずれの分子とも相同性を示さないことから考えて、120-kDa 蛋白がアポトーシス細胞の食食に機能する可能性は低いと考えられる。また、第2章でも述べたが、崩壊した幼虫組織の断片を食食して排除するのは120-kDa 蛋白を発現した顆粒細胞ではなく多核化した特殊な細胞であることが形態観察から示されている (Whitten, 1964)。以上の知見を総合すると、120-kDa 蛋白は幼虫組織の断片やアポトーシス細胞を食食するレセプターとして機能する分子ではないと考えられる。

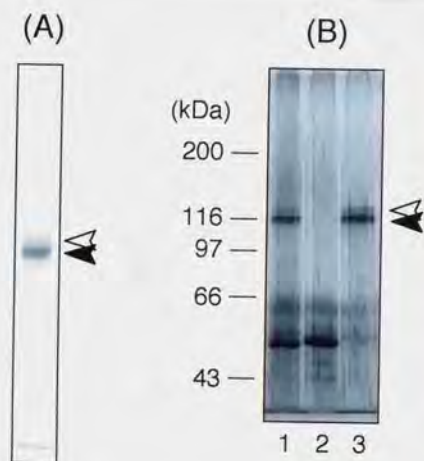


図9 精製した 120-kDa 蛋白の SDS-PAGE 解析と免疫沈降解析

(A) 精製した 120-kDa 蛋白 1 μg を SDS-PAGE (7%) により分離し、CBB 染色によりシグナルを検出した。(B) 精製した 120-kDa 蛋白を 9C8 抗体を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降物を SDS-PAGE (7%) により分離したのち銀染色でシグナルを検出した。黒の矢印は、120-kDa 蛋白を、白ぬきの矢印は 130-kDa 蛋白を示す。

1 TTTCTTTAAGTCTGCATTGCAGAGCGGTTGCATATTTTTAAATTTCTTCTTAAAAAAT
 62 AATTTCAATATTTTTAATCATAAAAATTTACATTCGTATTAATTAACATCATGAAGAAT
 1 M K N
 122 TGTGCTTTTAAATAATTTGCCTAATAAGTGTTTTAAATATTCAGGCGGTTATGACCTGTACC
 4 L L L I I C L I S V L N I A G V M T C T
 182 GAAAGAAAATCCACCACTAAGTATCGTGTTCCCTTCGGTAACCATGCGTAAATATCCTGAC
 24 E R K S T T K Y R V S L V T M R K K Y P D
 242 TCTGGTGCAGATGTTCAAGTTTTGAGTGTCAATAATCCTTTGGTACTAAGGCCCATACGT
 44 S G A D C S S F E C H N P L V L R P I R
 302 GAACTTATACGGATGTAGAAGAAGTTTGTGTGAGGTTATAAAAACCATCCCAACG
 64 E T Y T D V E E V C C E G Y K N H S T T
 362 GGCGAATGTGTACCTCTTGCCTGGACTGCAAGCATGGCAAGTGTATAACGGCTAAATGTA
 84 G E C V P S C V D C K R G K C I R P N V
 422 TGCCTCTGCCTACATGGCTATCAAAAATTTAAAAACAAAACCATTTGTGAACCTCTGTGC
 104 C L C L H G Y Q N F K N E S I C E P L C
 482 CTAATAACCTGTGTCAATGGCAAATGCTCTGCACCGGAAGTGTACGTGTAAATGAGGGT
 124 L N T C V N G K C S A P E V C T C N E G
 542 TACGCCCTTTGTTAATGGCAGCCGAACAGTGTGCCAGGCAACCTGCAAAAGTATGCGACTG
 144 Y A F V N G S R T V C Q A T C K D V D C
 602 ACAAATGGCCATTGTGATGAGAAGAACAAGTGCACCTTGCAATTCGGTTATGTCTCGAC
 164 T N G H C D E K N R C T C N F G Y V L D
 662 GACAGTCTTAAACGTTGTGTGCCATTCTGTGAGGAAGCCTGTGAGAAATGGTCTGTGCAGC
 184 D S L K R C V P F F C E E A C E N G L C S
 722 AAACCCAAATGAATGTACCTGCAATCCCGGCTATGCTTTACGTTGGGTAGTATAAACGTA
 204 K P N E C T C N P G Y A L R L G S I N V
 782 TGTGATCCGATTTGTTGACATGTTCGAATGGTCAATGTACGGCACCAGGAACTATGFGAA
 224 C D P I I C S T C S N G E C T A P E V C E
 842 TGTAAACCGGCTTACACTAATGTAGGTGGCTTGGCTTACAGAGAAGTGTGTGCCGATGCG
 244 C K P G Y T N V G G L A S E N C V P V C
 902 AAGGAGAAGTGTGCAATGCATTCGTGACAGGCCCGATCAATGTACCTGCTTTCCAAAT
 264 K E K C V N A F C T A P D Q C T C C F P N
 962 CATGCCATCGCAACGGTTCGGCGTATATTTGTGAGCCGACATGTAAGAATGGCTGTGAA
 284 H A Y R N G S R I F C E P T C K N G C E

図 10 120-kDa 蛋白の cDNA および予想アミノ酸配列

上段に核酸配列、下段にアミノ酸配列を示す。下線は、精製標品から決定した部分アミノ酸配列を示し、丸で囲んだ cystein 残基 (C) は決定した N 末端を示す。また、点線で PSORT により予測されるシグナル配列、2 重線は膜貫通領域、ボックスは N 型糖鎖付加可能部位を示す。

1022 AATGGTTTCTGCAQTGAGCCGGGCAAAATGTAATGTCTATGAGGGCTATGAAAAAACCAGAA
304 N G F C S E F G K C E C H B G Y E K T E

1082 CCCCATCTCTGTTCGCCTATATGCAAAAGAACCTTGTGTAAATGGTTACTGTGCGCCACCG
324 P H L C S P I C K E P C V N G Y C A A P

1142 DATACATGTAATAATGAGGGTTATACGGTATGCCGATACCAAGGAGAAGGTATGTGAA
344 D T C K C N E G Y T Y A D T K E K V C

1202 CCTTACTGTCCCAAGGTTGCAAGAATGGCAATTGTACGGCTCCCGGTGTATGTACCTGT
364 P Y C P K G C R N G H C T A P G V C T C

1262 AATCCAGGCTATCAGTCTTTATTATCTATCATTGTATACCAATATGTACTAAGCCCTTG
384 N P G Y Q S L L F Y H C I P I C T K P C

1322 CTCCAAGGCACCTTGCACCTGCCGATACCTGTCTGCTGTTTCATGGGCTATAAGCCGAAC
404 L Q G T C T A P D T C R C F M G Y K P N

1382 GGTAAAAATCCCAATCAATGTGATCCGGTGTGAATTTCCGATTGTGGCCATGCAACGTGT
424 G K N P N Q C D P V C N F D C G H G K C

1442 ATTGACCCGGGCATATGCAGCTGTGATGCTGGCTATGAGAAGAAATGGCTAACGGGTAAA
444 I A P G I C S C D A G Y E K E W L T G K

1502 TGTGAACCATATGTCGGCAAGATGTATAAACAGTGTGTGTTCCGGGGAGGTATATGT
464 C E P Y Q R C P Q R C I N S V C S A G I C

1562 CGCTGTTATGAGGGCCATCGTTTGCCTGAAGGCTCTACAAATATCTGTGATCTGTGTGG
484 R C Y E G H R L R E G S T N I C D P V C

1622 TTGCCCAAGTGTATTAATAGCAATTGGCTGGAACCAAAATACCTGTGAATGCTGGGATGGT
504 L P N C I N S N C V E P N T C E R W D G

1682 TATCAGGATACCAAACTTCGAATTTATGTGTGCCACGCTGTAGCCCTACCTGTGAGAAC
524 Y E D T X H S N L C V A R C R P T C E N

1742 GGCAAATGTGTGGCACCAACAAATGTCAAGTGTAAATGAGGGCTATAAAGTAAACCAACTCA
544 G K C V A P N K C Q C N E G Y K V T N S

1802 TCGATGCCACACAACCTGTCAAGCSTTATGCAAGGAAACGTGTATTAATGTGAGTGTCC
564 S M P H N C Q A L C K E T C I N A E C R

1862 AAACCGAATACCTGTGAGTGTAGATGGTTATCGTTTCTAGCGAACAGCACTGTAGAA
584 K P N T C E C L D G N S Y R F L A N S T V E

1922 TGTGAGCCTGTATGTGAACAGTCAATGTGAGCATGGCCGCTGTGTGGCACCAAAATTTGTGT
604 C E P V C E Q S C E H G R C V A P N L C

1982 AGTTGTGACACGGGCTTTATATCGCGTATTAATCGTGACAGTGGTCTCACGGAATGTGTG
624 S C D T C F I S R I N R D S G L T E G C V

2042 GGCTATGCAATGAATGGAACCTGTGGGAATGGCACATGTGCCCACTTCTACATTTGTGTCAA
644 G Y C N E W N C R N G T C A T S T L C Q

2102 TGCAGTGACGGTTGGGTATATGACTCGCAACGAGGCCAATGTATGCCAGATGATGTGGCC
664 C S D G W V Y D S Q R G Q C M P D D V A

2162 AAGCAAAAGAACTACAAAAGCGGTGACCTGTCTCCCGTGGACAATTGCTGCCGTCGGCC
684 K E R I Y K S G V P V S R W T I A A V A

2222 ATTTATTTTGTTCGGCTTTGTGTATTTGGCTTAATAATGGTGTCCGTGAAATGTCGCCCG
704 I I L F A V C V L A L I I M V F R E I A R

2282 CGTAAATCAATGACAAACACAGGTGCGCCTTATTGAGAATCCCTCATTGGGTGATG
724 R K I N D K Q Q V R L I E N P S F G V L

2342 ATGCCGAATGATGTCTGTGTGAGGATGAAGCGGAAACGGATACTACACAGGAATTA
744 M P N D M C C R E D E A E T D T T Q E L

2402 AGCAGTGAATTTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTTGTATACTAAGCTACCT
764 S S *

2462 AAGTGGCTAATTTGTTAAGTTTAAAATTCCTTGGCAGAAATAGACCACGACTGCCCGC
2522 AAAGCCGATATCATAAGTATCTAGATGTAAAGAGTTTTCTTTTAAAATTTATTTTTTT
2582 TTTATAGTTTTTAAATTTGTTTTTATTTACATATACAAATATATATAAATCTCTCTCT
2642 TTTTTTATAAATAATCTCATTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
2702 GTCTCTGTATTTTTGTATCCCGTTTTCTTTTTCTATTTTTTGTCTAATAATPATG
2762 TAACCTTGTCTTTTAAATAATTTAATTTTAAATTTATTTTATAAATCAATAAATAAAA
2822 TGCTGGC

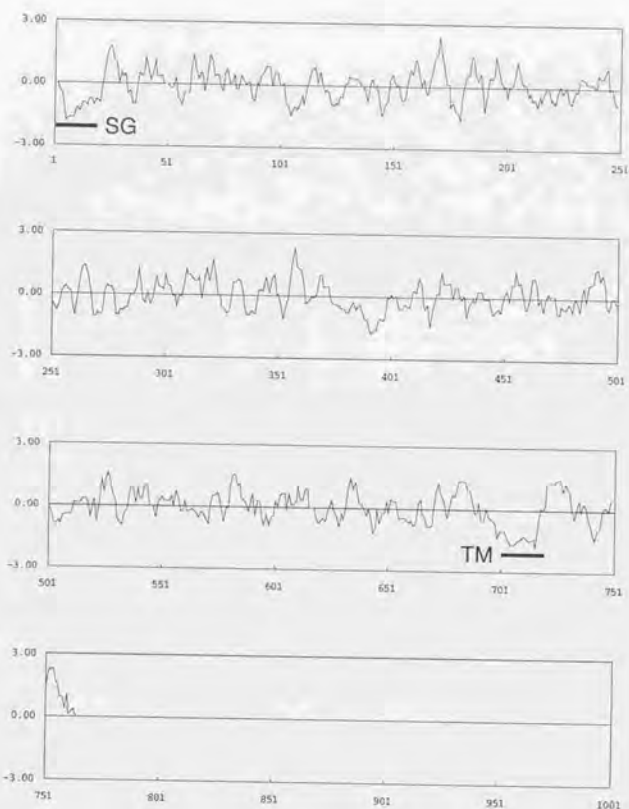


図 11 120-kDa 蛋白の hydropathy profile

Hopp & Woods の方法により 120-kDa 蛋白の親水性・疎水性解析を行った結果を示す。横軸はアミノ酸残基番号を示し、縦軸はアミノ酸の親水性・疎水性を示す。数値が大きいほど親水性が高く、低いほど疎水性が高いことを示す。図中太線は、PSORT により予測されたシグナル配列 (SG) および膜貫通領域 (TM) を示す。

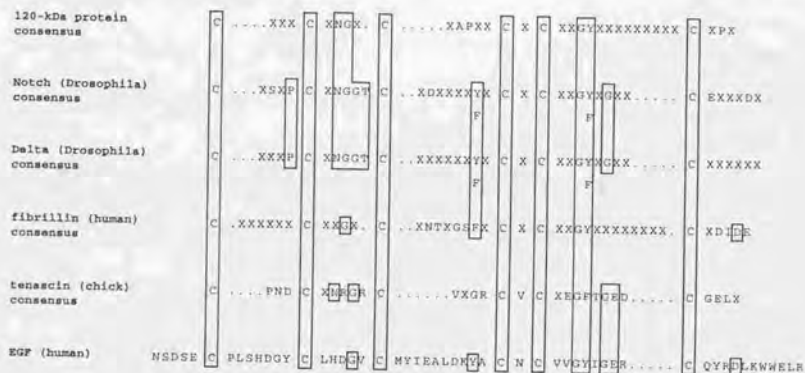


図 13 120-kDa 蛋白と他の蛋白の EGF-like repeat のコンセンサス配列の比較

保存されている6つのシステイン残基を網掛けのボックスで示す。また異なる蛋白のコンセンサス配列間で保存されているアミノ酸をボックスで示す。配列間でシステイン残基が重なるようにスペースを挿入シットで示す。

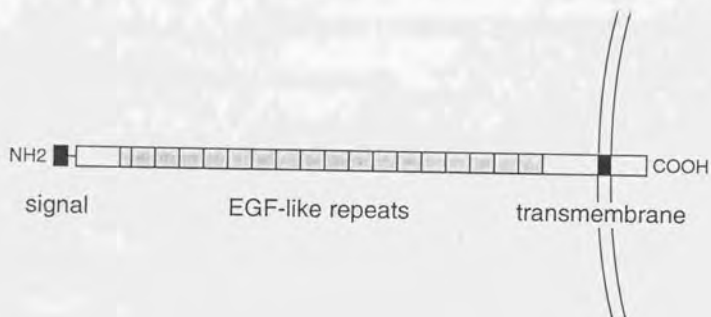


図 14 120-kDa 蛋白の一次構造の模式図

黒のボックスでシグナル配列 (signal) および膜貫通領域 (transmembrane) を示し、網掛けのボックスで個々の EGF-like repeat を示す。

(A) 120-kDa protein

N-terminus XTERKSTTKYRVSLVXMRKYDXGAD

Endopeptidase Lys-C fragments

fr. 16 XNEGYTYADTK

fr.25 PGYXNVGGLAXENXVPVXK

fr.31 TXNFGYVLDDXLK

fr.35 QQVXLIENPXFVGLMPNDMXXR

(B) 130-kDa protein

N-terminus XTERKSTTKYRVSLVXMRKY

表3 120-kDa 蛋白および130-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列

(A) 120-kDa 蛋白。(B) 130-kDa 蛋白。アミノ酸は一文字表記で示す。Xは決定できなかったアミノ酸を示す。

第4章

総括と展望

第1節 本研究の総括

完全変態昆虫の変態期には、幼虫組織の組織崩壊と再構築が劇的におこる。これまでに、センチクバエ変態時の脂肪体と呼ばれる組織の崩壊を再現する *in vitro* 系の解析を通して、蛹体液細胞が幼虫脂肪体を崩壊させることが示され、変態にともなって体液細胞の脂肪体に対する認識が転換した結果、体液細胞が脂肪体を排除するようになるという可能性が示唆されていた (Kurata, *et al.*, 1989)。

私は、体液細胞の幼虫組織に対する認識転換を分子レベルで説明する作業仮説として、変態にともなって体液細胞の表面に脂肪体などの幼虫組織を認識する分子が新たに発現して体液細胞がその組織を排除の対象として認識するようになるというモデルを立てた。そして、この作業仮説を実証することを最終的な目標として研究を行った。本研究では、そのような不要幼虫組織の認識を担う分子の候補として、蛹化にともなって体液細胞の細胞表面に発現が誘導される蛋白質を同定し、その性状解析と一次構造解析を行った。以下に本研究で明らかにした成果をまとめる。

- (1) 蛹化にともなって体液細胞の細胞表面に発現する膜蛋白を同定し、解析を行うための分子的ツールを得る目的で、蛹化後 4-5 時間の初期の

蛹体液細胞に対するモノクローン抗体系列の作製を行った。その結果、幼虫体液細胞とは反応せず蛹体液細胞の細胞表面と特異的に反応する 4 種のモノクローン抗体を得た。

(2) 得られたモノクローン抗体は全て分子量 120-kDa の同一の蛋白質を認識することを示した。そして、この 120-kDa 蛋白質は幼虫体液細胞には発現せず、蛹化初期に体液細胞に発現が誘導されることを明らかにした。このことは、120-kDa 蛋白質は筋組織や脂肪体といった幼虫組織の組織崩壊過程と同時に発現することを示しており、120-kDa 蛋白質はこれら幼虫組織の崩壊過程に関与しているものと考えられた。

(3) 120-kDa 蛋白質は蛹化後 4-5 時間の初期の蛹において他の組織には発現せず、体液細胞に特異的に発現することを示した。さらに、120-kDa 蛋白質は蛹体液細胞のなかでも、カテプシン B を発現・分泌して幼虫脂肪体を崩壊させる細胞である顆粒細胞に特異的に発現することを明らかにした。このことから、120-kDa 蛋白質は蛹体液細胞が脂肪体などの幼虫組織を認識する機能を担うことが示唆された。

(4) 120-kDa 蛋白質の精製、部分アミノ酸配列の決定、cDNA クローニングを行った。その結果、120-kDa 蛋白質は細胞外領域にタンデムに並んだ

17 個（不完全なものまで含めると 18 個）の EGF-like repeat を有する新規な I 型膜蛋白であることを明らかにした。

以上の成果は、完全変態昆虫の蛹化時に体液細胞に発現が誘導される膜蛋白を同定し、その一次構造を明らかにした初めての例である。本研究で解析を行った 120-kDa 蛋白は、変態期における体液細胞の幼虫組織に対する認識転換機構を解明するうえで重要な手がかりを与えるものと期待される。

しかしながら、120-kDa 蛋白が変態の過程で不要になった幼虫組織を認識する分子であることの証明は本研究ではなされておらず、今後の解析が必要である。最後に、これからの課題をまじえてこの研究の展望を述べたい。

第2節 今後の展望

(1) 変態期における体液細胞による幼虫組織の認識機構の解明

第1にあげるべき課題は、120-kDa 蛋白が変態の過程で不要になった幼虫組織を認識する分子であることを証明することである。具体的には、まず、体液細胞が脂肪体を *in vitro* で崩壊させる系に今回得られたモノクローン抗体を添加して、脂肪体の崩壊が阻害されるか否かを簡単に調べることができる。または、抗体を個体に注入して *in vivo* で脂肪体や筋組織の崩壊が阻害されるかを調べる実験も考えられる。抗体により脂肪体や筋組織の崩壊が阻害されたならば、120-kDa 蛋白はこれら幼虫組織の崩壊に関与することが示される。そして、蛹体液細胞をモノクローン抗体で刺激して、カテプシン B が分泌されるか否かを調べ、もし分泌が起こったならば、抗体が脂肪体の認識を mimic したことになり、120-kDa 蛋白が脂肪体の認識を担う分子であることが示される。さらに、120-kDa 蛋白の細胞外ドメインのリコンビナント蛋白を作製して、抗体の代わりに *in vitro*、*in vivo* 両面での組織崩壊の阻害効果を調べることも可能であろう。

さて、以上の解析は主に *in vitro* の実験系を利用して 120-kDa 蛋白の

機能を明らかにする方法であるが、*in vitro* であるために artifact を見る危険性がある。120-kDa 蛋白が実際に生体内で不要幼虫組織を認識する機能を担うことを最終的に証明するためには、逆遺伝学的な解析を行って *in vivo* での機能を明らかにする必要があると考えられる。具体的には、センチクバエは逆遺伝学の手法が確立されていないので、完全変態昆虫であるショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いて遺伝学的解析を行う。すなわち、120-kDa 蛋白のショウジョウバエ・ホモログを単離して、その knockout mutant さらには細胞内領域を欠失した 120-kDa 蛋白を強制発現させた mutant を作製する。そしてその表現系を解析し、変態期に脂肪体などの幼虫組織が崩壊しなければ、120-kDa 蛋白がその組織の認識を担う分子であると結論される。

次に重要な問題は、120-kDa 蛋白の認識するリガンドの同定である。体液細胞が幼虫組織の何を認識しているのかを明らかにすることは、序論で述べた「非自己マーカー」モデルを検証するうえで必須であり、そのような「非自己マーカー」が同定されて初めて体液細胞の「自己」「非自己」の識別機構が解明される。具体的にはセンチクバエを用いて 120-kDa 蛋白と結合する蛋白質を免疫沈降法などにより同定し、局在組織を明らかにすることでこの問題に対する手がかりが得られると考えている。

本研究では、120-kDa 蛋白の蛹化にともなう発現に関して解析を行ったが、120-kDa 蛋白が胚発生期でも体液細胞に発現するかどうかという問題は興味深い問題である。胚発生過程は、幼虫の体制が形成される過程であり、変態期と並んで組織の崩壊、再構成、細胞死が劇的に起こる時期である。もし、120-kDa 蛋白が胚発生期の体液細胞にも発現するならば、120-kDa 蛋白は発生過程において不要な自己組織の排除に普遍的に機能する可能性が予想される。

(2) 免疫機構の個体発生、系統発生的起源の解明に向けて

序論において私は、「免疫機構は、個体発生過程で個体の identity を確立するシステムとして進化・発生した」という仮説に立って、免疫機構が個体の identity を確立する原理を解明することが本研究の大目標であることを述べた。本研究では、そのような普遍的な原理を明らかにするために、昆虫の変態という一見特殊な現象にモデルを求めた。モデルとして適当な選択であるか否かは議論の余地のあるところではあるが、原理が基本的であればあるほど、どのような生物にもあてはまるものであり、一見特殊であっても単純な現象から出発してこそ普遍的な法則を

導くことができる。現に、分子生物学はそのような立場で遺伝や形態形成のメカニズムなど、生命の基本的な法則性を解明してきた。単純でありなおかつ本質的な原理を反映しているという点で、センチニクバエの変態期における脂肪体の崩壊という現象は優れたモデルであると言える。本研究で解析を行った 120-kDa 蛋白は、昆虫の変態という特殊な現象にとどまらず、広く免疫機構の個体発生、系統発生的起源を明らかにするうえでひとつの重要な手がかりになることを期待している。

第5章

材料と方法

実験動物

センチクバエ *Sarcophaga peregrina* は Ohtaki (1966) に従って飼育した。3 齢幼虫の体表を乾燥させると蛹化が始まることを利用して蛹化のステージを同調した。3 齢幼虫は体表乾燥後 27°C で飼育すると平均 16 時間で囲蛹殻を形成し蛹になる (この時期の蛹を白蛹と呼ぶ) が、体表乾燥による同調では蛹化に数時間のばらつきが生じるので、白蛹を集めることでさらに厳密に (1 時間以内のばらつきで) 同調を行った。

体液細胞の採集

操作は全て 4°C でおこなった。30-120 匹の 3 齢幼虫あるいは蛹を 30 分以上氷冷後、頭部を切断して体液を 4 ml の insect saline 中に回収し、100 × g、3 分遠心して得られる沈殿を体液細胞として回収した。体液細胞は、insect saline に tapping で懸濁し同様の遠心を 2 回おこなって洗浄した。混入する脂肪体や頭部などの debris は、suspension を数分静置して沈降させて除いた。体液細胞を培養する場合および生体液細胞の間接蛍光抗体法をおこなう場合は細胞の viability を高くするために、1-5% の FBS を添加した insect saline を用いて回収した。

体液細胞と脂肪体の共培養と脂肪体崩壊の測定

脂肪体は、3 齢幼虫を氷冷後頭部を切断除去し、胴体部分について

insect saline 中で表皮を裏返して内部を露出させた後、実体顕微鏡下で摘出した。培養には、ハサミで約 100 個の脂肪細胞からなる断片に切断して用いた。

各時期の体液細胞を上記のように回収し、 1×10^6 cells/ml となるように 5% FBS、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin を含む Grace's insect medium (GIBCO BRL) に懸濁し、その 1.0 ml を 24 well plate で 25°C、2 時間培養した。各 well を培地で 1 回洗浄して死細胞を除き、400 μ l の培地および約 100 個の脂肪細胞からなる脂肪体片を加え共培養した。25°C で 24 時間培養し、脂肪体崩壊率を以下のように計算した。

$$\text{脂肪体崩壊率 (\%)} = (\text{生じた脂肪体断片数} - 1) / (\text{全脂肪細胞数} - 1) \times 100$$

蛹体液細胞に対するモノクローン抗体の作製

(1) 免疫

蛹化後 4 から 5 時間の蛹から体液細胞を回収し、 2×10^6 cells/ml となるように insect saline に懸濁し、その 1.0 ml を Balb/c マウス (6 週齢、メス) の腹腔内に注射し免疫した。追加免疫はその 4、8、13、19 週後に行い、計 5 回免疫を行った。追加免疫は、幼虫体液細胞には発現せず蛹体液細胞に発現する抗原に対するモノクローン抗体をより多く得るた

めに、Barclay & Smith (1986) の方法に従って行った。すなわち、 2×10^6 cells の蛹体液細胞を insect saline 0.5 ml に懸濁した後、幼虫体液細胞を免疫したマウスから採取した抗血清 0.5 ml を加え、氷上に 30 分間静置したのち免疫した。

(2) ハイブリドーマの作製

最終免疫の 4 日後にマウスから脾細胞を調製し、ポリエチレングリコール M_r 1,500 (Boehringer Mannheim) を用いてマウスミエローマ細胞 PA1 と細胞融合を行った。HAT 培地によりハイブリドーマのみを選択的に培養した。ハイブリドーマのスクリーニングは、培養上清を用いて固定条件での体液細胞の間接蛍光抗体法および体液細胞膜画分の dot-blot を独立に行い、幼虫体液細胞と比較して蛹体液細胞と選択的に反応することを指標に行った。陽性クローンは限界希釈法を 3 回行ってクローニングした。

(3) 固定条件での体液細胞の間接蛍光抗体法

幼虫および蛹体液細胞を insect saline 中に 10^6 cells/ml となるように懸濁し、その 15 μ l を 12 well スライドガラスの各 well にのせ、15 分静置して細胞をスライドガラス上に張り付かせた。4% paraformaldehyde および 0.02% glutaraldehyde を含む PBS を 15 μ l 加え、10 分間固定を

行った。PBS で洗浄後、100 mM glycine および 1% BSA を含む PBS を 30 μ l 加えて 1 時間静置して未反応の aldehyde 基をブロックした。培養上清のアッセイまで 0.1% BSA および 0.02% NaN_3 を含む PBS 中に 4°C で保存した。

ハイブリドーマ培養上清 20 μ l を各 well に加えて 1-2 時間反応させた。PBS-T にて 2 回洗浄後、1% BSA を含む PBS に 1/40 希釈した FITC 標識抗マウス 2 次抗体 (DAKO) 20 μ l と 1-2 時間反応させた。同様に洗浄した後、10 mg/ml DABCO を含む 90% glycerol / 10% PBS にてマウントし、Olympus BH-2 蛍光顕微鏡を用いて蛍光を観察した。

(4) 体液細胞膜画分の dot-blot

体液細胞膜画分は 4°C で以下のように調製した：体液細胞を 1mM PMSF, 100 μ g/ml leupeptin, および 0.1 μ g/ml pepstatin を含む 10 容の PBS 中でガラスホモジェナイザーを用いて氷上で破碎し、1,000 $\times g$, 10 分遠心して脱核した。そしてその上清を 100,000 $\times g$, 30 分遠心し、生じた沈殿を蛋白濃度が 1.0 mg/ml となるように PBS に懸濁して膜画分とした。その 3.0 μ l を 96-well microtiter plate 規格の間隔で nitrocellulose filter (Millipore) にスポットし、5% skim milk を含む PBS にて 1 時間ブロッキングした後風乾し、培養上清のアッセイまで 20°C で保存した。

dot-blot apparatus にフィルターを固定し、50 μ l のハイブリドーマ培養上清を加え、1時間反応させた。フィルターを取り出し、0.5% skim milk および 0.1% Triton X-100 を含む PBS にて洗浄後、 125 I 標識抗マウス 2 次抗体 (Fab)₂ fragment (Amersham, 0.1 μ Ci/ml) と 1 時間反応させた。そして同様に洗浄した後、Bio Imaging Analyzer (Fuji Photo Film) にてシグナルを検出した。

(5) モノクローン抗体の精製

モノクローン抗体は、ハイブリドーマを腹腔内に移植したマウス (Balb/c、メス、リタイア) の腹水から、20%-50% 飽和硫酸沈殿、hydroxyapatite (Asahi Optical) カラムを用いた HPLC (Waters) により電気泳動上均一な成分にまで精製した。

(6) モノクローン抗体の isotype の決定

モノクローン抗体の class、subclass、light chain type は Mouse monoclonal antibody isotyping kit (Amersham) に従って決定した。

生体液細胞の間接蛍光抗体法

操作はすべて氷上で行った。10⁶ cells の体液細胞をハイブリドーマ培養上清 100 μ l に懸濁して 40 分反応させた。100 \times g、3 分遠心して沈殿

した細胞を 5% FBS を含む PBS 500 μ l に懸濁した。この操作を 3 回行って抗体を洗浄した後、5% FBS / PBS に 1/20 希釈した FITC 標識抗マウス 2 次抗体 (DAKO) 100 μ l と 40 分反応させた。同様に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

体液細胞蛋白のイムノブロット

体液細胞を 1 mM PMSF, 150 μ g/ μ l leupeptin, 150 μ g/ μ l pepstatin を含む 10 容の 1.5 \times sample buffer に懸濁し、超音波処理によりホモジエナイズした。100 $^{\circ}$ C, 2 分間加熱して変性させた後、10,000 \times g, 10 分で 2 回遠心を行い、上清をサンプルとした。蛋白定量、SDS-PAGE の後、transfer buffer 中で電氣的に (70 mA, 16 時間) PVDF filter (Millipore) に転写した。フィルターは 5% skim milk を含む TBS-T にて 1 時間ブロッキングを行った後、モノクローン抗体を加え 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後、5% skim milk を含む TBS-T にて 1/4,000 希釈したペルオキシダーゼ標識 2 次抗体 (Fab')₂ fragment (Amersham) と 1 時間反応させた。洗浄後、ECL (Amersham) を用いた化学発光法によってシグナルを検出した。

免疫沈降

操作はすべて 4 $^{\circ}$ C で行った。蛹体液細胞 10⁶ cells あたり、1mM

PMSF, 100 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 100 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 5 mM EDTA を含む NP40 lysis buffer 1.0 ml に懸濁し、30 分静置後、10,000 $\times g$, 10 分遠心して上清を回収した。上清に 50% (V/V) protein G-Sepharose (Zymed) 25 μl を加えて 1 時間反応させ、非特異的に結合する蛋白質を吸収した。吸収した lysate にモノクローン抗体を 1-10 μg 加え 30 分反応させた後、IgM に関しては抗マウス 2 次抗体 (DAKO) を 0.5 μl 加え、さらに 30 分反応させた。そして、50% (V/V) protein G-Sepharose (Zymed) 25 μl を加えて 1 時間反応させ抗原抗体複合体を回収した。NP40 lysis buffer にて 4 回洗浄後、2 \times sample buffer を 40 μl 加えて 85 $^{\circ}\text{C}$, 10 分加熱し、沈降物を溶出させた。溶出された免疫沈降物は SDS-PAGE 後、銀染色 (第一化薬) またはイムノプロットにより解析した。

120-kDa 蛋白の発現組織の解析

蛹化後 4-5 時間の蛹から脂肪体、筋組織、肢原基、脳および眼原基の各組織を insect saline 中実体顕微鏡下で摘出した。体液細胞は上記の様に採集した。体液は体液細胞を採取した際の遠心上清とした。各組織を 1 mM PMSF, 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ leupeptin, 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pepstatin を含む 10 容の 1.5 \times sample buffer に懸濁し、超音波処理によりホモジェナイズしたのち 100 $^{\circ}\text{C}$, 2 分間加熱して変性させた後、10,000 $\times g$, 10 分で 2 回遠心を行い、上清をサンプルとした。蛋白定量を行ったのち、9C8 抗体を用い

て上記の通りイムノブロット解析を行った。但し、検出は ECL plus (Amersham) を用いた化学発光法によった。

120-kDa 蛋白の精製

(1) Coupling of MAb 9C8 to Sepharose 4B

精製した 9C8 抗体を 10 mM citrate buffer, pH 6.8 に対して 4°C で一晚透析して buffer を置換した。

0.5 g の CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) を 1mM HCl で膨潤・洗浄後、10 mM citrate buffer, pH 6.8 でよく洗浄した。ここに透析した 2.0 mg の 9C8 抗体を加え 4 ml の buffer 中で 2 時間反応させた。上清の OD₂₈₀ をモニターして抗体が上清に残っていないことを確認した。次に 1M ethanolamine, pH 8.2 10 ml に置換して 1 時間反応させ、未反応の CNBr をブロックした。最後に、0.5 M NaCl を含む 0.1 M acetate buffer, pH 4.0 および 0.5 M NaCl を含む 0.1 M Tris buffer, pH 8.0 で交互に 3 回洗浄し、0.1% NaN₃ を含む PBS 中に 4°C で保存した。

(2) 9C8 抗体カラムクロマトグラフィー

操作はすべて 4°C で行った。1,500 匹分の蛹体液細胞を 1mM PMSF, 100 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml pepstatin, 5 mM EDTA を含む NP40

lysis buffer 45 ml によって lysis し、30 分静置後 $10,000\times g$, 10 分遠心して上清を回収した。MAb 9C8-Sepharose, 1.2 ml にその lysate を加え、3 時間攪拌して抗原を結合させた。そして、抗原を結合させた MAb 9C8-Sepharose をカラムに移した後、24 ml の NP40 lysis buffer でカラムを洗浄した。さらに、24 ml の 1M NaCl および 0.1% NP40 を含む 50 mM Tris buffer, pH 8.0 にて非特異的に結合している蛋白質を洗浄した後、12 ml の 150 mM NaCl および 0.1% NP40 を含む 10 mM Naphosphate buffer, pH 6.8 に buffer を置換した。そして、0.1% NP40 を含む 100 mM glycine-HCl, pH 2.5 によって溶出を行い、0.5 ml ずつ分画した。SDS-PAGE を行って 120-kDa の蛋白質を含む画分を同定し、プールした。精製された蛋白を 9C8 抗体が認識することを免疫沈降によって確認した。

120-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列の決定

精製した 120-kDa 蛋白 60 μg (0.5 nmol) を SDS-PAGE 後、transfer buffer 中で電氣的に (70 mA, 16 時間) nitrocellulose filter (S&S) に転写した。そしてフィルターを Ponceau S 染色して 120-kDa のバンドを切り出し、フィルターごと endopeptidase Lys-C (Boehringer Mannheim) により消化した。得られた分解産物を逆相 (C18) カラム HPLC (Waters) により分画・精製し、明瞭なピークを与えたペプチド断

片について、protein sequencer (Shimazu, PPSQ-10)を用いてアミノ酸配列を決定した。

120-kDa 蛋白の N 末端アミノ酸配列の決定

精製した 120-kDa protein 50 μ g (400 pmol) を SDS-PAGE 後、CAPS buffer 中で電氣的に (70 mA, 16 時間) PVDF フィルター (Millipore) に転写した。そしてフィルターを CBB 染色して 120-kDa のバンドを切り出し、protein sequencer (Shimazu, PPSQ-10)を用いてアミノ酸配列を決定した。

120-kDa 蛋白の cDNA クローニング

(1) 蛹体液細胞 total RNA の調製

蛹化後 0-2 時間の蛹約 700 匹から回収した体液細胞 (packed cell 0.6 g) に約 3 ml の guanidinium buffer を加え直ちに Polytron で破碎する。Homogenate に 5% sarcosyl を 1/10 量加え、10,000 $\times g$, 10 分で 2 回遠心を行い debris を除いた。超遠心チューブに入った 1.3 ml の 5.7 M CsCl / 100 mM EDTA cushion の上に homogenate を積層し、Sw55Ti rotor (Beckman) を用いて 35,000 rpm、16 時間遠心を行い、沈殿を total RNA として回収した。Urea buffer に RNA を溶かし、さらに PCIA および CIA 抽出を行って混入する蛋白質を除いた。最後に 80% ethanol

沈殿を行い、沈殿を水に溶解し、 OD_{260} により定量 ($1 OD_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$)、純度の検定 ($OD_{260} / OD_{280} = 2$) を行った。

(2) 蛹体液細胞 cDNA ライブラリーの構築

調製した total RNA から、oligotex-dT30 super (Takara)を用いて poly A (+) RNA を精製した。そのうちの $5\mu\text{g}$ を用いて ZAP Express cDNA synthesis kit および Gigapack *in vitro* packaging kit (Stratagene)に従って cDNA ライブラリーを構築した。その結果、 2.2×10^6 の独立のクローンからなる cDNA ライブラリーが構築された。

(3) RT-PCR による 120-kDa 蛋白 cDNA 断片の検出

cDNA ライブラリーの作製で用いた白蛹体液細胞 total RNA を鋳型に、SuperScript Preamplification System (GIBCO BRL)を用いて oligo-dT priming により cDNA 合成を行った。そして部分アミノ酸配列から設計した degenerate プライマーを用いて PCR を行い、480bp の cDNA 断片を検出した。得られた PCR 産物は pGEM-T vector (Promega) を用いてサブクローニングし、塩基配列を決定してこのサブクローンがプライマーに用いた 120-kDa 蛋白の部分アミノ酸配列をコードしていることを確認した。

(4) 120-kDa 蛋白の cDNA クローニング

(2)で得られたサブクローンのインサート部分を PCR によって増幅し、その PCR 産物を Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (Takara) に従って ^{32}P 標識した。そして、標識した PCR 産物をプローブとして蛹体液細胞 cDNA ライブラリーより plaque hybridization 法によりクローニングを行った。得られた陽性クローンからアルカリ/SDS 法によりプラスミドを調製し、dye terminator 法により auto-DNA sequencer (ABI)を用いてその塩基配列を決定した。決定した塩基配列から順次シーケンス・プライマーを作製して全長を決定した。

(5) plaque hybridization

大腸菌 (XL-1 blue strain) に蛹体液細胞 cDNA ライブラリーを有するファージを感染させ、プレート上で 37°C 、約 10 時間培養して plaque を形成させた。プレートを 4°C 、1 時間冷却後、nylon membrane (NEN, Colony/Plaque Screen) をプレート上にのせ、replica (duplicate) を作製した。フィルターは 1.5 M NaCl を含む 0.2 N NaOH、 $2\times\text{SSC}$ を含む 0.4 M Tris-HCl, pH 7.6、 $2\times\text{SSC}$ に順次 1-2 分浸し、その後 80°C で完全に乾燥させた。フィルターを $2\times\text{SSC}$ で濡らし、hybridization solution 中で 65°C 、約 30 分間 prehybridization を行った後、プローブを加えて 65°C 、over night で hybridization を行った。0.1% SDS を含

む 2×SSC 中で 65°C、15 分間フィルターを洗浄後、autoradiography によりシグナルを検出した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli の方法 (1970) に従った。泳動後のゲルは Fairbanks らの方法 (1971) による CBB 染色、あるいは銀染色 (第一化薬) によって染色し、蛋白を検出した。

蛋白定量

BSA (fraction V) を標準として、Lowry *et al.* (1959) の方法に従って行った。1/5 の反応系で行った。

緩衝液の組成

CAPS buffer

10 mM CAPS, 10% methanol, pH 11.0

CIA chloroform : isoamylalchol = 24 : 1

guanidinium buffer

4 M guanidinium isothiocyanate, 0.1 M Tris-HCl (pH7.5),

1% 2-mercaptoethanol

hybridization solution

0.5 M Na-phosphate (pH 7.2), 1 mM EDTA, 7% SDS,
0.2 mg/ml ssDNA

insect saline

130 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.0 mM CaCl₂

NP40 lysis buffer

50mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP40

PBS 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄,
1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4

PBS-T PBS containing 0.1% Tween 20

PCIA phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1

sample buffer

25 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS,
5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol

1×SSC 50 mM sodium citrate, 150 mM NaCl

TBS 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl

TBS-T TBS containing 0.1% Tween 20

transfer buffer

192 mM glycine, 25 mM Tris, 20% methanol,
0.02% SDS

Urea buffer

4 M urea, 0.1 M Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA

参考文献

- Appella, E., Weber, I. T., Blasi, F. (1988) Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett* **231**, 1-4
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. (1995) Notch signaling. *Science*, **268**, 225-232
- Barclay, S. L. and Smith, A. M. (1986) Rapid isolation of monoclonal antibodies specific for cell surface differentiation antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4336-4340
- Beck, G. and Habicht, G. S. (1996) Immunity and the invertebrates. *Scientific American* **275** (5), 42-46
- Chain, B. M., Leyshon-Sorland, K., and Siva-Jothy, M. T. (1992) Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analysed using monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **103**, 1261-1267
- Fadok, V. A., Savill, J. S., Haslett, C., Bratton, D. L., Doherty, D. E., Campbell, P. A., and Henson, P. M. (1992) Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.* **149**, 4029-4035

Fairbanks, G., Steck, T. L., and Wallach, D. F. H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617

Gupta, A. P. (1985) Cellular elements in the hemolymph. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology" (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds.), Vol. 3, pp. 401-451. Pergamon, Oxford.

Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J., Ezekowitz, R. A. (1996) Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431-443

Hume, D. A., Perry, V. H., and Gordon, S. (1983) Immunochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J. Cell Biol.* **97**, 253-257

Janeway, C. A., Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* **13**, 11-16

Kobayashi, H., Kurata, S., and Natori, S. (1995) Purification of a 200-kDa protein-binding protein from the fat body of *Sarcophaga peregrina* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**, 393-399

Krieger, M., and Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 601-637

Kurata, S., Komano, H., and Natori, S. (1989) Dissociation of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) fat body by pupal hemocytes *in vitro*. *J. Insect Physiol.* **35**, 559-565

Kurata, S., Kobayashi, H., and Natori, S. (1991) Participation of a 200-kDa hemocyte membrane protein in the dissociation of the fat body at the metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev. Biol.* **146**, 179-185

Kurata, S., Saito, H., and Natori, S. (1992a) Purification of a 29-kDa hemocyte proteinase of *Sarcophaga*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 911-914

Kurata, S., Saito, H., and Natori, S. (1992b) The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev. Biol.* **153**, 115-121

Laemmli, U., K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lang, R. A. and Bishop, J. M. (1993) Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* **74**, 453-462

Lang, R., Lustig, M., Francois, F., Sellinger, M., and Plesken, H. (1994) Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodelling. *Development* **120**, 3395-3403

Locksin, R. A. (1985) Programmed cell death. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology" (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds.), Vol. 2, pp. 301-317. Pergamon, Oxford.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275

Maslen, C. L., Corson, G. M., Maddox, B. K., Glanville R. W., and Sakai, L. Y. (1991) Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. *Nature* **353**, 334-337

Morris, L., Graham, C. F., and Gordon, S. (1991) Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80. *Development* **112**, 517-526

Mullett, H., Ratcliffe, N. A., and Rowley, A. F. (1993) The generation and characterisation of anti-insect blood cell monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **105**, 93-100

Nardi, J. B. and Miklasz, S. D. (1989) Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of *Manduca sexta*. *Tissue & Cell* **21**, 559-567

Nepomuceno, R. R., Henschen-Edman, A. H., Burgess, W. H., Tenner, A. J. (1997) cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis *in vitro*. *Immunity* **6**, 119-129

Ohtaki, T. (1966) On the delayed pupation of the flesh fly, *Sarcophaga peregrina* Robineau-Desvoidy. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **19**, 97-104

奥山元 (1995) 学位論文

Pearson, C. A., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J., and Chiquet-Ehrismann, R. (1988) Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *EMBO J* **7**, 2977-2982

Pearson, A., Lux, A., Krieger, M. (1995) Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4056-4060

Rheuben, M. B. (1992) Degenerative changes in the muscle fibers of *Manduca sexta* during metamorphosis. *J. exp. Biol.* **167**, 91-117

Saunders, J., Jr. (1966) Death in embryonic systems. *Science* **154**, 604-612

Savill, J., Dransfield, L., Hogg, N., and Haslett, C. (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**, 170-173

多田富雄 (1993) 免疫の意味論、青土社

Takahashi, N., Kurata, S., and Natori, S. (1993) Molecular cloning of cDNA for the 29 kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body during metamorphosis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), *FEBS Lett.* **334**, 153-157

Tauber, A. I. (1990) Metchnikoff, the modern immunologist. *J. Leucocyte Biol.* **47**, 561-567

Tauber, A. I. (1994a) The immune self: theory or metaphor? *Immunol. Today* **15**, 134-136

Tauber, A. I. (1994b) The immune self: theory or metaphor? Cambridge University Press.

Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A., and Hartenstein, V. (1994) Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-1837

浦崎哲也 (1994) 修士論文

Vaessin, H., Bremer, K. A., Knust, E., and Campos-Ortega, J. A. (1987) The neurogenic gene Delta of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurogenic territories and encodes a putative transmembrane protein with EGF-like repeats. *EMBO J.* **6**, 3431-3440

Weber, R. (1964) Ultrastructural changes in regressing tail muscles of *Xenopus* larvae at metamorphosis. *J. Cell. Biol.* **22**, 481-487

Wehrle, B. and Chiquet, M. (1990) Tenascin is accumulated along developing peripheral nerves and allows neurite outgrowth *in vitro*. *Development* **110**, 401-415

Werb, Z., Tremble, P., and Damsky, C. H. (1990) Regulation of extracellular matrix degradation by cell-extracellular matrix interaction. *Cell Differ. Dev.* **32**, 299-306

Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., Artavanis-Tsakonas, S. (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**, 567-581

Whitten, J. M. (1964) Haemocytes and the metamorphosing tissues in *Sarcophaga bullata*, *Drosophila melanogaster*, and other cyclorrhaphous diptera. *J. Insect Physiol.* **10**, 447-469

Willott, E. , Trenzcek, L., Thrower, W., and Kanost, M. R. (1994) Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, 417-423

謝辞

私は博士課程から東京大学大学院薬学系研究科発生細胞化学教室に所属して本研究を始めました。本論文を終えるにあたり、私が同教室で研究することを快く引き受けてくださり、常に暖かい励ましをもって御指導頂きました。名取俊二教授にまず第一にこころからの敬意と感謝の念を述べたいと思います。

同教室の久保健雄助教授には、研究を進めて行く際に多くの本質的な御助言と御批判を頂きました。深く感謝いたします。

同教室の小林綾子助手には、本研究を直接御指導頂きました。小林さんには、私の自主性を重んじて頂き、私がやりたい方向に研究が向かうように時に厳しくも暖かく御指導頂きました。小林さんの御指導なくして本研究を進めることはできなかったでしょう。また、同教室の本間光一助手には、研究を進めるに際して実に適切な御助言を頂きました。本当にありがとうございました。

モノクローン抗体の作製は東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室・青木淳賢助手に教えて頂きました。青木先生には細胞培養の基礎から懇切丁寧に教えて頂き、この場を借りてこころから御礼申し上げます。

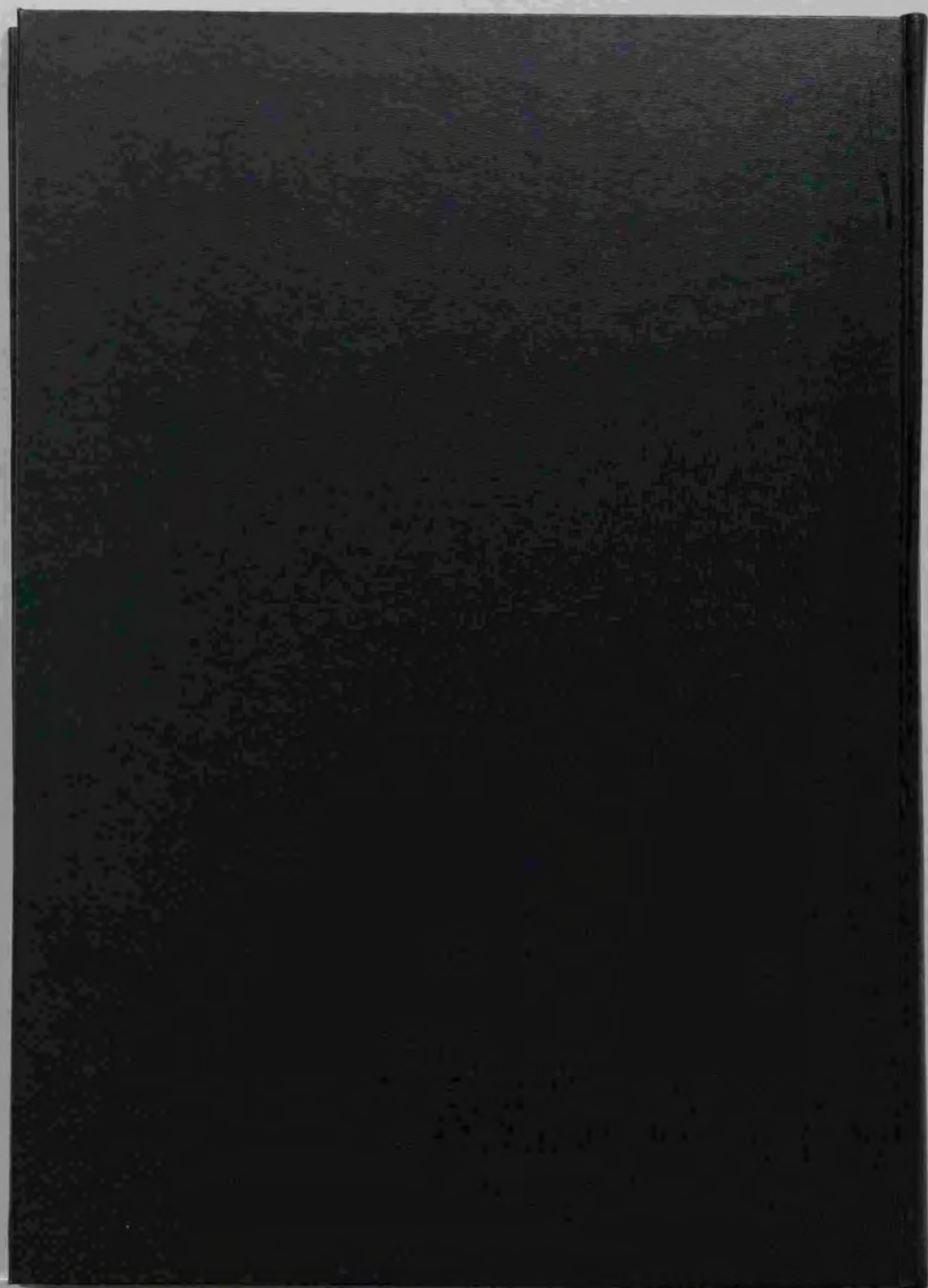
発生細胞化学教室の皆様には、研究のことに限らず様々なことを沢山教えて頂きました。この場を借りてこころから御礼申し上げます。

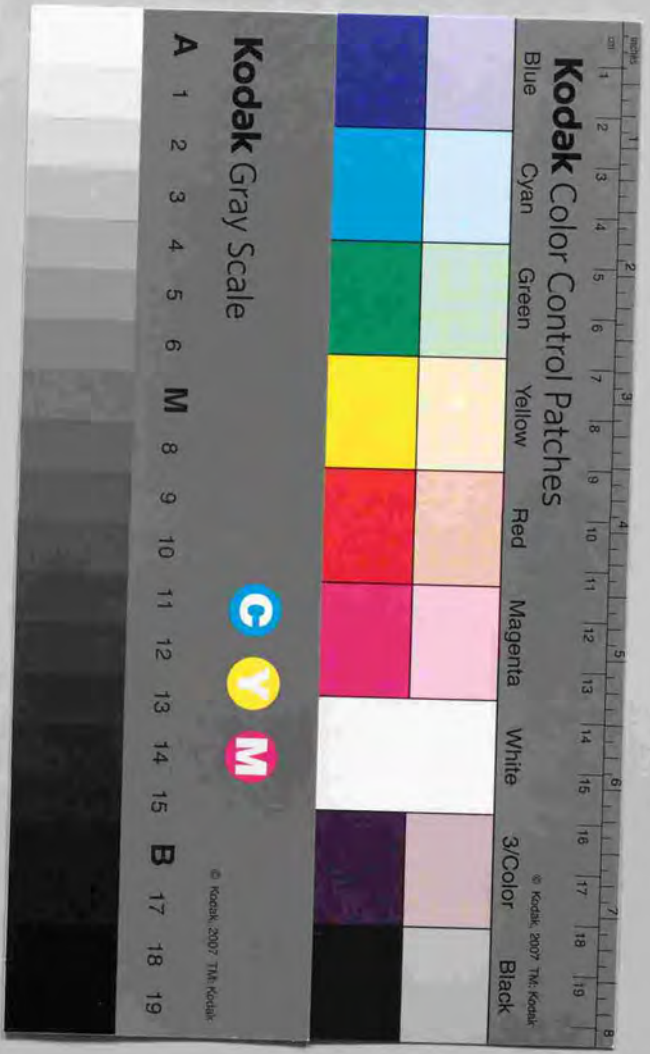
金沢工業大学場の研究所・清水博所長および東京電機大学理工学部・山口陽子助教授には、学部4年生と修士課程をご指導頂きました。本研究では両先生にご指導頂く機会はありませんでしたが、生命の本質に対して深く問いかけ、細かな誤りを気にせず普遍的かつ本質的な考えを大胆に主張する両先生の姿勢には、深く影響を与えられ、研究に取り組むうえで大きな指針となってきました。両先生にはこの場を借りて、ここからの敬意と感謝の念を述べたいと思います。

最後に、日々の研究を進めるうえで、心身両面にわたって生活を支えてくれた家族と何人かの友人にここから感謝いたします。

1998年3月

堀 昌平





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak 2007 TM Kodak