

2022年11月16日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学  
北里大学

## 膜タンパク Newtic1 が赤血球の再生因子分泌に関わる ～イモリの再生で新仮説を提唱～

有尾両生類のイモリは、ヒトを含む四肢動物の中でも例外的に、一生を通じて体のさまざまな部位を何度でも繰り返し再生できます。しかし、この能力はイモリ固有の遺伝子によるものか、それとも四肢動物に共通の遺伝子で説明できるかは、いまだに明らかになっていません。

この問いに答えるため、本研究チームがアカハライモリの遺伝子を網羅的に解析し、見つけた遺伝子が *Newtic1* です。イモリ固有ではありませんが、有尾両生類（イモリ・サンショウウオの仲間）にしか存在しないユニークな遺伝子で、膜タンパク質をコードしています。アカハライモリの肢再生の研究から、この遺伝子はさまざまな分泌因子を再生芽（肢の再生が行われている部分）に運ぶ赤血球で発現していることが分かっています。しかし、膜タンパク質である *Newtic1* と因子分泌との関係は明らかではありませんでした。

本研究では、形態学的手法により、*Newtic1* タンパク質が赤血球の発達した辺縁帯の微小管に沿って並ぶ球状構造体を構成していること、そしてその球状構造体が成長因子の一つである  $TGF\beta 1$  を内包している可能性を明らかにしました。

これらの結果は、*Newtic1* が  $TGF\beta 1$  を含む分泌小胞の膜タンパク質であるとともに、微小管に結合し、辺縁帯の発達に伴って分泌小胞を細胞膜に輸送するのに貢献していることを示唆しています。

本研究成果は、*Newtic1* や赤血球、赤血球が分泌する  $TGF\beta 1$  の臓器再生における機能の更なる解明に貢献します。

### 研究代表者

筑波大学生命環境系  
千葉 親文 教授

北里大学医療衛生学部  
小畑 秀一 准教授

## 研究の背景

有尾両生類のイモリは、ヒトを含む四肢動物（4本足の脊椎動物）の中でも例外的に、一生を通じて体のさまざまな部位を何度でも繰り返し再生できるという特徴があります。果たしてこの能力がイモリ固有の遺伝子によるのか、それとも四肢動物に共通の遺伝子だけで説明できるのかは、いまだに明らかではありません。本研究チームはこの問いに答えるため、アカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）の遺伝子を網羅的に解析しました。その結果、再生に伴って発現が増加する遺伝子を2018年に発見し、*Newtic1*と名付けました（Casco-Robles et al., Scientific Reports 8: 7455, 2018）。*Newtic1*はイモリ固有の遺伝子ではありませんでしたが、生物界全体で見ると有尾両生類（イモリ・サンショウウオの仲間）にしか存在せず、サカナやカエルはもちろん、ヒトにも存在しないユニークな遺伝子です。

*Newtic1*は41.7 kDの膜タンパク質をコードしており、アカハライモリの体内を循環する赤血球（すべて有核赤血球）の80–90%を占める未成熟赤血球（polychromatic normoblast；以下、PcNobと呼びます）のごく一部に発現します。PcNobは平たい楕円体をしており、*Newtic1*タンパク質はその辺縁部（赤道）に沿ってリング状に存在します。本研究チームによるイモリの肢再生の研究から、*Newtic1*タンパク質を発現したPcNobは、再生芽<sup>注1</sup>にさまざまな分泌因子を運んでいることが明らかになっています。

PcNobが運ぶ分泌因子には成長因子（TGF $\beta$ 1、IGFII、BMP2、PDGFC、VEGFC、nsCCN）や酵素（マトリクスメタロプロテアーゼ：Col-a、Col-b、MMP3/10、MMP9、MMP21）があります。本研究チームはさらに、再生芽形成に伴い、TGF $\beta$ 1（transforming growth factor- $\beta$ 1）とBMP2（bone morphogenetic protein 2）が、*Newtic1*タンパク質を発現しているPcNobから分泌されることを明らかにしています。

しかし、膜タンパク質である*Newtic1*が液性因子の分泌にどう関わるのかについては明らかではありませんでした。

## 研究内容と成果

本研究ではまず、アカハライモリの肢の再生芽から少量の血液を採取し、PcNobにおける*Newtic1*タンパク質の局在を光学顕微鏡で解析しました（図1）。*Newtic1*タンパク質を蛍光抗体で標識し、その分布パターンを分析した結果、赤道に沿ってリング状に見えていた*Newtic1*の蛍光は、多数の蛍光顆粒が赤道の細胞膜直下に集積したものであることが判明しました（図1 F, G）。より未成熟なPcNobでは、多数の蛍光顆粒が赤道直下だけでなく、細胞質全体に広く分布していました（図1 H）。共焦点レーザー顕微鏡で解析した結果、顆粒の直径は明るい蛍光を示すコアの部分で200–300 nmありました（図1 I）。

再生芽のPcNobについて、*Newtic1*の蛍光顆粒と辺縁帯<sup>注2</sup>との関係を調べた結果、*Newtic1*の蛍光顆粒は辺縁帯が発達したPcNobでしか観察されることが判明しました。また、*Newtic1*の蛍光顆粒は、辺縁帯の微小管に近接して存在することが明らかになりました。

*Newtic1*の蛍光顆粒の実体を明らかにするために、免疫電子顕微鏡解析<sup>注3</sup>を行いました。その結果、*Newtic1*の増感銀粒子が微小管に近接して存在する球状構造体を構成していることが判明しました（図2）。球状構造体の直径は約100 nm（図2 G, H）でした。

次に、*Newtic1*の球状構造体あるいは*Newtic1*タンパク質自体が微小管に結合している可能性を検証するために、再生芽の血球から微小管を含む不溶性のタンパク質を抽出し、分析しました。その結果、この画分に*Newtic1*タンパク質が含まれることが明らかになりました。

以上の結果から、Newtic1 は、直径が約 100 nm の球状構造体を構成し、微小管に直接的あるいは間接的に結合するタンパク質であることが明らかになりました。

本研究チームは、Newtic1 が膜タンパク質であることから、辺縁帯に集積している球状構造体が分泌小胞ではないかとの仮説を立てました。そこでまず、PcNob に小胞体やゴルジ体など、タンパク質のパッケージングや修飾、輸送に関わる細胞小器官が本当に存在するのか調べることにしました。PcNob の小胞体とゴルジ体を生きたまま蛍光染色し観察した結果、PcNob が発達した小胞体とゴルジ体を持つことが明らかになりました（図 3 A）。また、細胞内膜系<sup>注4</sup>を良好に保存する条件で固定した PcNob の透過型電子顕微鏡観察を行った結果、辺縁帯付近の細胞質に小胞が多数認められるとともに、辺縁帯に近接する細胞膜に、物質の分泌あるいは取り込みを示唆する  $\Omega$  状の構造が認められました（図 3 B）。これらの結果は、PcNob には細胞内膜系が発達しており、タンパク質の活発な細胞内輸送が行われていることを示唆しています。

そこで、研究グループは分泌小胞が運ぶ因子に着目しました。もし Newtic1 の球状構造体が分泌小胞であるとすれば、球状構造体は分泌されるべき因子を内部に含んでいるはずですが、研究グループは既に、再生芽の PcNob が TGF  $\beta$  1 と BMP2 を分泌することを突き止めていました。そこで、これら 2 因子と Newtic1 タンパク質を異なる蛍光抗体で標識し、それらの位置的關係を共焦点レーザー顕微鏡で解析しました。その結果、TGF  $\beta$  1 の蛍光は Newtic1 と同様に、辺縁帯に沿って顆粒状に分布することが明らかになりました。一方、BMP2 の蛍光は辺縁帯に観察されませんでした。TGF  $\beta$  1 の蛍光と Newtic1 の蛍光の領域面積を、Newtic1 の蛍光顆粒（すなわち球状構造体）ごとに比較した結果、TGF  $\beta$  1 の方が Newtic1 より領域面積が小さく、TGF  $\beta$  1 が Newtic1 の内側に存在することが明らかになりました（図 4）。また、TGF  $\beta$  1 を含まない Newtic1 顆粒も少数（9%程度、n=6）存在することが明らかになりました。これらの結果は、Newtic1 の球状構造体が TGF  $\beta$  1 を運ぶ分泌小胞である可能性を強く示唆します。

本研究により、Newtic1 が TGF  $\beta$  1 を運ぶ分泌小胞の膜タンパク質である可能性が示唆されました。また、Newtic1 タンパク質は、微小管に結合することから、分泌小胞を微小管に繫留する働きがあるものと考えられます。アカハライモリの肢再生過程では、PcNob が血管の伸長に伴って再生芽の内部に集積するようになります。PcNob 内では赤道直下の細胞質で微小管の束化（すなわち辺縁帯の発達）が進み、Newtic1 を膜に持つ分泌小胞が赤道の細胞膜の近くに集まるようになります。これにより、Newtic1 は TGF  $\beta$  1 の細胞内輸送に貢献すると考えられます。すなわち、Newtic1 は PcNob の再生芽組織への TGF  $\beta$  1 分泌に積極的に関わっていると考えられます（図 5）。

#### 今後の展開

研究グループは今後、蛍光タグを付けた Newtic1 タンパク質を発現するアカハライモリを作出し、外傷部の赤血球で Newtic1 の発現が誘導されるしくみの解析や、分泌小胞の細胞内動態のライブイメージング解析を行う計画です。ヒトを含む哺乳類では一般に、外傷部は線維化し、瘢痕を残して治癒します（瘢痕治癒）。TGF  $\beta$  1 は外傷後の炎症抑制に貢献しますが、線維化を促進する因子としても知られています。一方、イモリは線維化したり瘢痕化したりせずに組織を完全に再生することができます（無瘢痕再生）。本研究で示唆したように、イモリの肢再生芽の組織で TGF  $\beta$  1 が積極的に分泌されているとすれば、TGF  $\beta$  1 は線維化ではなく再生のために働いている（再生のために必要）と考えられます。研究グループは今後、遺伝子改変動物や細胞培養系を用いて、哺乳類とイモリにおける TGF  $\beta$  1 の機能的差異に関する研究を進める計画です。

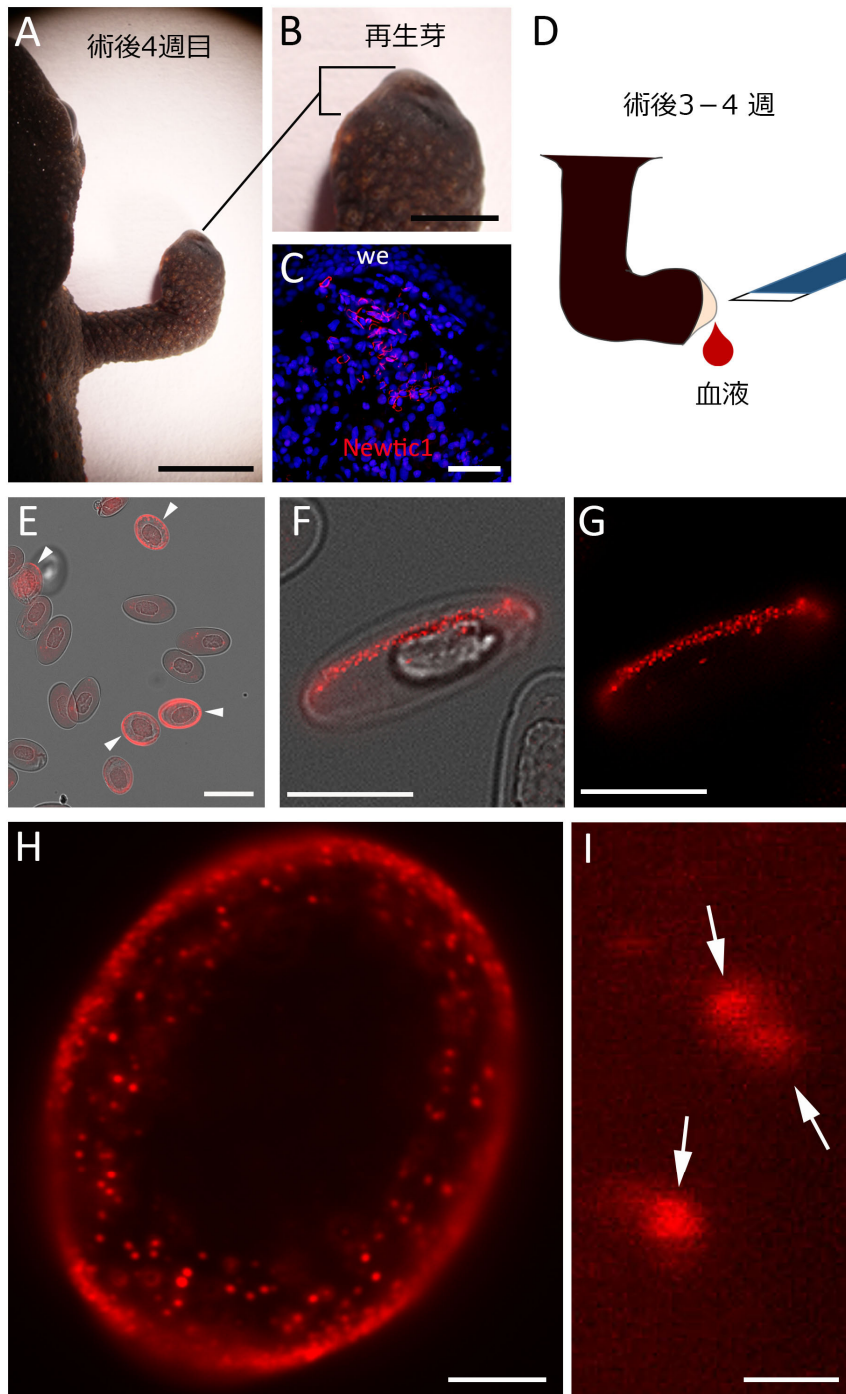


図1 アカハライモリの肢再生芽に集まる赤血球の Newtic1 抗体反応（蛍光免疫染色像）

A. 肢切断後 4 週目の肢。B. 再生芽の拡大。C. 再生芽の切片。内部に Newtic1 抗体反応（赤）を示す赤血球（PcNob）が集まっている。青：核。we: 傷表皮。D. 再生芽からの採血法を示す模式図。E. 再生芽の血液。矢頭は Newtic1 抗体反応を示す PcNob。Newtic1 抗体反応は PcNob の赤道に沿って観察される。F, G. PcNob の赤道に集まった顆粒状の Newtic1 抗体反応（Newtic1 顆粒）。H. 未成熟な PcNob の赤道と細胞質の両方に分布する Newtic1 顆粒。I. Newtic1 顆粒の共焦点レーザー顕微鏡像。三つの顆粒が認められる（矢印）。顆粒の蛍光が強いコア部分の直径は 200-300 nm。スケールバー：5 mm (A); 2 mm (B); 100  $\mu$ m (C); 40  $\mu$ m (E); 20  $\mu$ m (F, G); 5  $\mu$ m (H); 500 nm (I)。

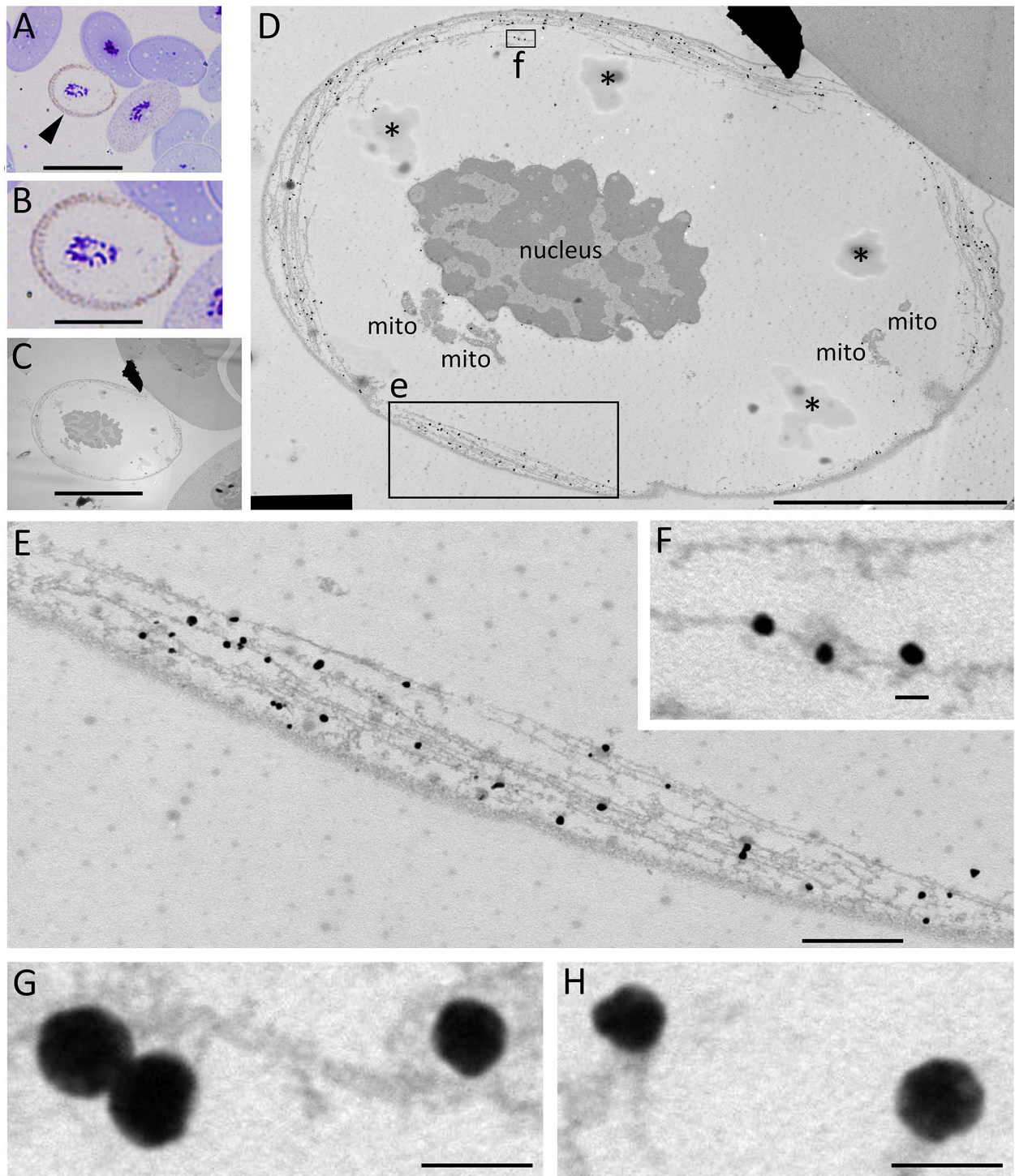


図2 Newtic1 顆粒の免疫電子顕微鏡解析。A、B. PcNob の透過光像。この方法では、Newtic1 顆粒が茶色に見える。C. 同じ細胞の超薄切片 (80–90 nm) の透過型電子顕微鏡像。D. C の拡大。Nucleus : 核。mito : ミトコンドリア。E、F. それぞれ C の e と f の領域の拡大。PcNob の辺縁帯を構成する微小管に沿って多数の黒い顆粒が並んでいる様子が観察される。G、H. 顆粒の拡大。顆粒の正体は、直径約 100 nm の球状構造体であった。Newtic1 は辺縁帯の微小管に集積する球状構造体を構成する膜タンパク質であると考えられる。スケールバー : 40  $\mu\text{m}$  (A); 20  $\mu\text{m}$  (B, C); 10  $\mu\text{m}$  (D); 1  $\mu\text{m}$  (E); 100 nm (F–I)。

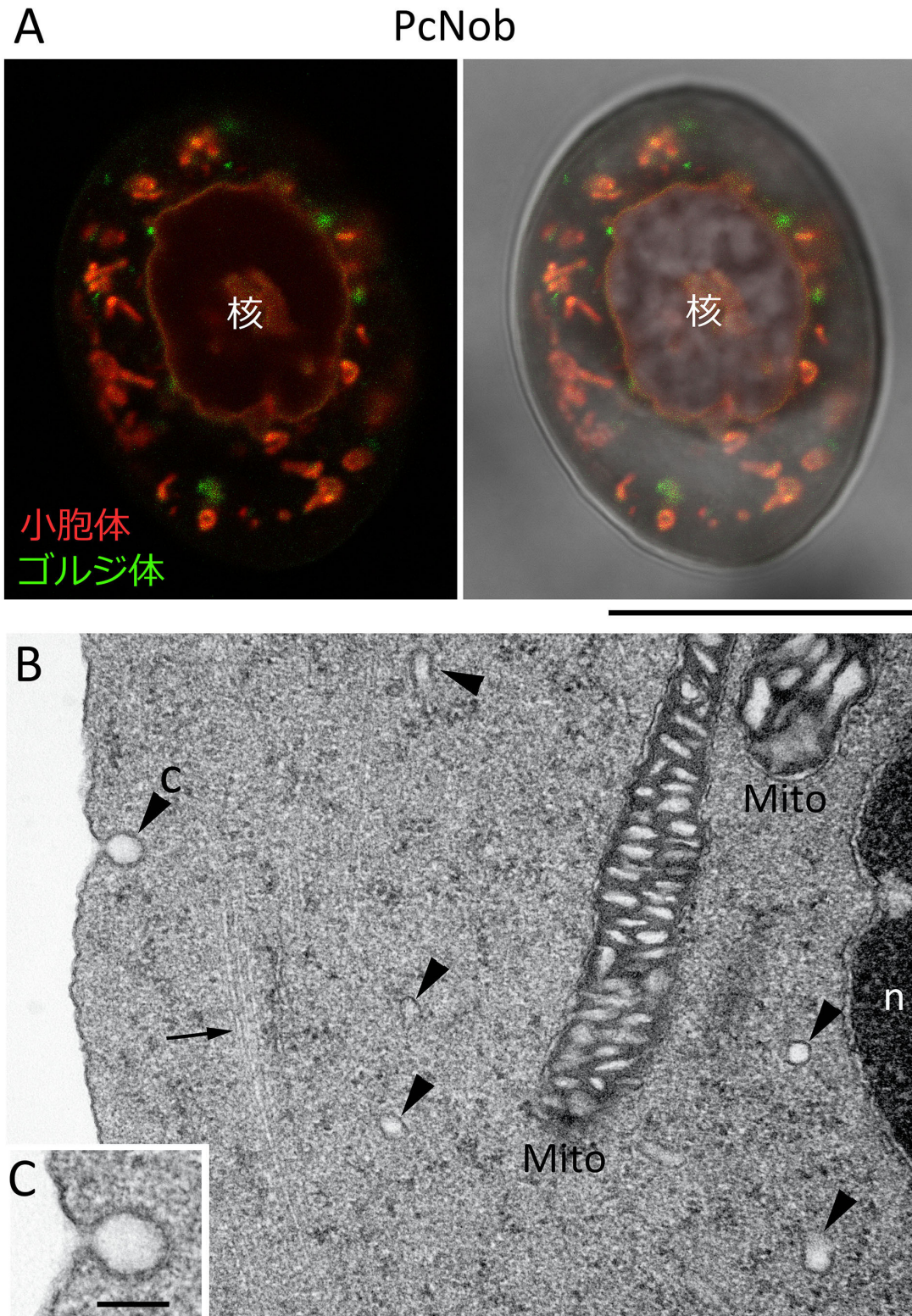


図 3 PcNob の発達した細胞内膜系。A. 細胞小器官の生染色像。細胞内にタンパク質のパッケージングや修飾、輸送に関わる小胞体（赤）とゴルジ体（緑）が確認される。B. 透過型電子顕微鏡像。細胞質には多数の小胞が観察される（矢頭）。また、矢頭 c で示すように、辺縁帯に近接した細胞膜にはしばしば、物質の分泌あるいは取り込みを示唆する  $\Omega$  型の窪みが観察される（C に拡大を示す）。n：核。Mito：ミトコンドリア。矢印：辺縁帯の微小管。スケールバー：20  $\mu$ m (A); 200 nm (B); 100 nm (C)。

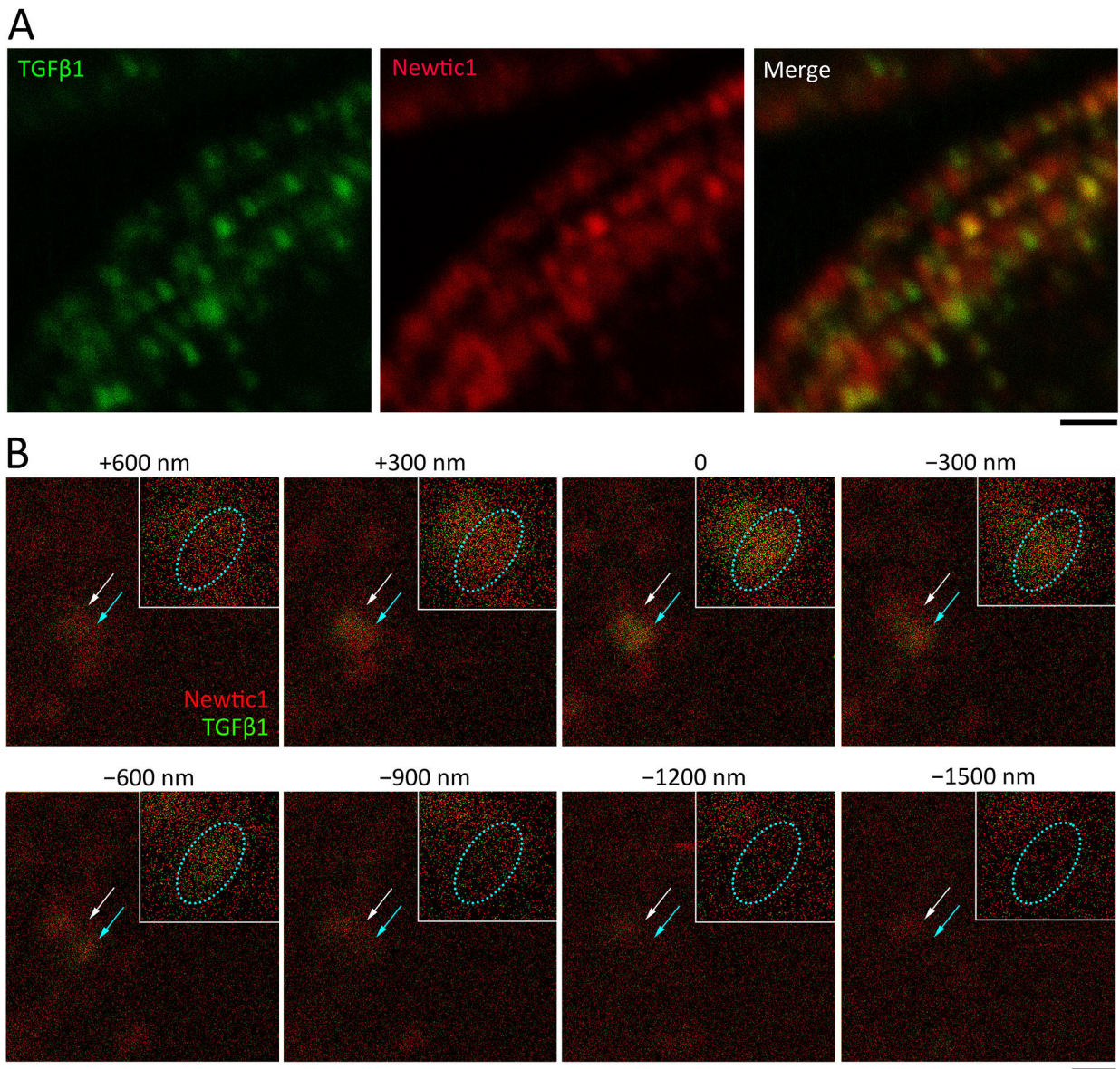


図4 Newtic1 と TGF $\beta$ 1 の位置関係。A. 辺縁帯における抗体反応。TGF $\beta$ 1 抗体反応 (緑) は、Newtic1 抗体反応 (赤) と同様に顆粒状で、辺縁帯に集積する。TGF $\beta$ 1 抗体反応は、その領域面積が Newtic1 抗体反応のそれより小さく、Newtic1 顆粒の内側にある。B. 単一顆粒 (すなわち球状構造体) の共焦点レーザー顕微鏡解析。顕微鏡の焦点面を上下に移動させたところ (0 を基準に上方向を+、下方向を-で示す)、例えば青矢印で示す顆粒 (右上のボックスに拡大を示す) では、+300 nm で Newtic1 の蛍光 (赤) が TGF $\beta$ 1 の蛍光 (緑) より先に現れ、0 に近づくにしたがって次第に TGF $\beta$ 1 の蛍光 (緑) が増加し、0 から下方に離れるといずれの蛍光も減少した。このことから、Newtic1 は TGF $\beta$ 1 よりわずかに顆粒の外側に存在していると考えられる。

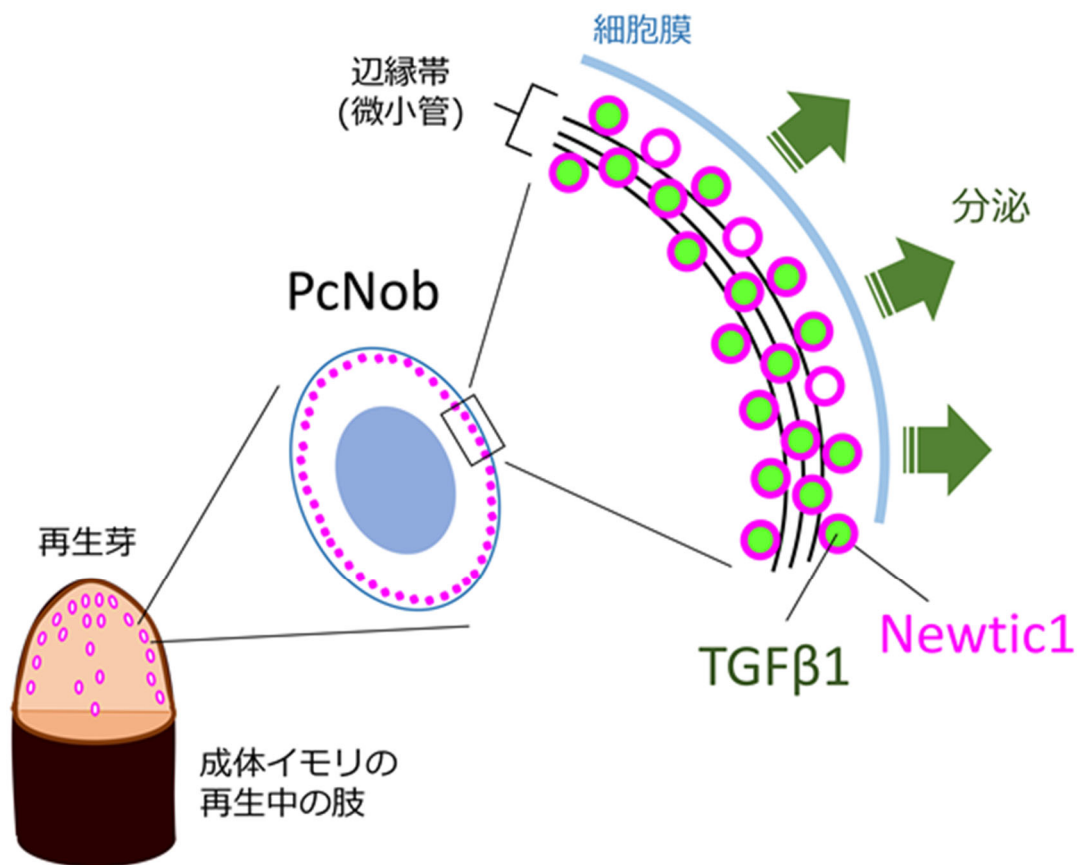


図5 Newtic1 は、PcNob の再生芽組織への  $TGF\beta 1$  分泌に貢献している (仮説)。Newtic1 は、PcNob が再生芽の内部に移動する過程で、 $TGF\beta 1$  を含む分泌小胞に特異的な膜タンパク質として発現するとともに、PcNob の辺縁帯の発達 (微小管の束化) に伴って、直接的あるいは間接的に微小管と結合することで、分泌小胞を細胞膜まで輸送する。

#### 用語解説

##### 注1) 再生芽

イモリでは肢が切断されると、切断部にこぶ状の膨らみが形成される。その内部には組織再生のもととなる細胞が集まっており、この細胞の集合体を再生芽と呼ぶ。

##### 注2) 有核赤血球と辺縁帯

哺乳類以外の脊椎動物では、体を循環している赤血球は基本的に有核である。哺乳類でも胎児期には有核赤血球が循環している。辺縁帯 (marginal band) は、有核赤血球の特徴の一つであり、血球の辺縁部 (赤道) に沿って存在する微小管の束からなる細胞内構造である。

##### 注3) 免疫電子顕微鏡解析

抗原に反応した抗体をさらに金コロイドなどで標識した抗体で検出することで、抗原部を電子顕微鏡下で検出する方法である。本研究では、PcNob の Newtic1 タンパク質に反応した抗体 (すなわち Newtic1 抗体) をさらに金コロイド抗体で標識し、銀増感した後、赤道を通る超薄切片 (80–90 nm) を作製し、観察した。

##### 注4) 細胞内膜系

細胞に存在する膜で区分された様々な構造 (細胞小器官) から構成される。真核細胞では、核膜や小胞体、ゴルジ体、小胞 (分泌小胞など)、リソソーム、エンドソーム、細胞膜が含まれる。葉緑体やミトコンドリアは含まれない。



## 研究資金

本研究は、科学研究費補助金（221S0002、18H04061）の一環として実施されました。

## 掲載論文

【題名】 Newtic1 is a component of globular structures that accumulate along the marginal band of erythrocytes in the limb blastema of adult newt, *Cynops pyrrhogaster*.

（Newtic1 はアカハライモリの肢再生芽の赤血球の辺縁帯に沿って集積する球状構造体の成分である）

【著者名】 Xutong Chen<sup>1</sup>, Ryo Ando<sup>1</sup>, Roman Martin Casco-Robles<sup>1</sup>, Martin Miguel Casco-Robles<sup>1</sup>, Fumiaki Maruo<sup>1</sup>, Shuichi Obata<sup>2</sup>, Chikafumi Chiba<sup>1</sup>.

1) 筑波大学生命環境系

2) 北里大学医療衛生学部

【掲載誌】 Biomedicines

【掲載日】 2022年11月1日

【DOI】 <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112772>

## 問合わせ先

【研究に関すること】

千葉 親文（ちば ちかふみ）

筑波大学生命環境系 教授

URL: <https://www.biol.tsukuba.ac.jp/~chichiba/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: [kohositu@un.tsukuba.ac.jp](mailto:kohositu@un.tsukuba.ac.jp)

学校法人北里研究所

総務部広報課

TEL: 03-5791-6422

E-mail: [kohoh@kitasato-u.ac.jp](mailto:kohoh@kitasato-u.ac.jp)