

審査の結果の要旨

氏名 丹治 貴博

申請者は、センチニクバエで見いだされたガラクトースをパプテン糖とするレクチンのショウジョウバエにおけるホモログの感染防御における役割について、生化学的並びに分子遺伝学的方法を用いて検証した。

すでに、センチニクバエの体液中に、ガラクトースをハプテン糖とするレクチンが見いだされている。このレクチンは感染時に病原体の表面糖鎖を認識して免疫系の活性化に寄与していると考えられているが、遺伝学的な立証はされていなかった。申請者は、遺伝学的解析が可能なショウジョウバエにこのレクチンのホモログが存在することに着目し、このレクチン遺伝子を欠損した変異体の作成とその表現系の解析を試みた。その結果申請者は、このレクチン (*Drosophila lectin*) がショウジョウバエの大腸菌による感染において機能していることを示す遺伝学的証拠を得た。また、申請者は、精製された *Drosophila lectin* と細菌との相互作用についても生化学的解析をおこなった。

まず最初に申請者は、このレクチン遺伝子の発現をRT-PCR法により解析した。その結果この遺伝子は、ショウジョウバエ三齢幼虫のクチクラ・筋肉、唾液腺、脂肪体、気管、成虫原基、脳、体液細胞と広汎な組織で発現していることが明らかとなった。また、申請者は、培養細胞であるSchneider-2 cell にトランスフェクションし、発現するリコンビナントレクチンが培養上清に検出され、分泌蛋白であることを示した。この結果から申請者は、このレクチンは病原体が体腔中に感染した時に、病原体に結合し機能する、という仮説を提唱した。

生化学的解析を行うために申請者は、Schneider-2 cell を用いて、レクチンの発現ベクターをトランスフェクションすることにより、恒常的にリコンビナントレクチンを分泌するstable cell line を樹立した。そして、その培養上清からリコンビナントレクチンを精製した。この精製蛋白は、そのN末端アミノ酸配列がnative のレクチンと完全に一致し、また一部糖鎖修飾を受けていることが明らかとなった。更に申請者は、native のレクチンと同様の赤血球凝集活性を持ち、その活性がハプテン糖であるガラクトースにより選択的に阻害される

ことを示した。

次に申請者は、*Drosophila lectin* が病原体感染時の異物認識に機能する可能性を考え、このレクチンに結合する細菌を検索した。その結果、大腸菌 (K-12 W3110、K-12 594) 及び、ショウジョウバエに自然感染することが知られている植物の病原体である *Erwiniachrysanthemi* との結合を検出した。グラム陽性菌も含め他の細菌との結合は検出されず、このレクチンは細菌に対して高い選択性を示すことが分かった。

また、申請者は、このレクチンが大腸菌を凝集させる活性を示すことを明らかにした。この結果から申請者は、レクチンによる細菌の凝集が、感染防御に有利に働く可能性を提唱した。さらに申請者は、レクチンが細菌を凝集し、免疫細胞表面の細菌に対する受容体に結合する細菌の量を増加させている可能性を指摘している。

ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析として、申請者この遺伝子を欠損したショウジョウバエ変異体を作製し、その個体における感染防御を解析した。*Drosophila lectin* 遺伝子欠損変異体の作製には、*Drosophila lectin* 遺伝子の 27 kb 下流に P エlement が挿入されたライン、P{EP}EP(2)1173 を用いた。P エlement が転移する際、元々挿入されていた位置近辺に高い確率で転移する local transposition という現象を利用して、*Drosophila lectin* 遺伝子の 6.4 kb 下流に P エlement が転移したラインを得た。次に、P エlement が転移する際、隣接するゲノム配列を巻き込んで挿入部位から脱落する imprecise excision という現象を利用して、*Drosophila lectin* 遺伝子を含む P エlement 挿入部位周辺約 9.6 kb が脱落したライン、E136 を樹立した。

申請者は、この変異体において、大腸菌 W3110 に対する感染防御能に影響があるか調べた。ショウジョウバエ幼虫に大腸菌を感染させた後の体内の菌数の変動が、変異体において影響を受けているか調べた結果、感染初期の大腸菌に対する感染防御能が低下していることが示された。また、この表現型は *Drosophila lectin* 遺伝子の導入により回復したことから、*Drosophila lectin* 遺伝子の欠損が原因であると考えられた。

次に、この変異体において細菌感染後の抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導に影響があるか調べた結果、発現量の減少は認められなかった。従って、*Drosophila lectin* は抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路は活性化しないことが示唆された。おそらく抗菌ペプチドとは異なるメカニズムで感染防御に寄与しているものと思われる。*Drosophila lectin* が体液

細胞による貪食等の細胞性免疫応答を促進している可能性が考えられる。

また、E136 において認められた感染防御能の低下が、*Drosophila lectin* と結合する細菌に選択的であるか知るために、*Drosophila lectin* との結合が検出されない大腸菌R1F470 を用いて同様の解析を行ったところ、W3110 を用いた時と同様感染防御能が低下していることが示された。*Drosophila lectin* 単独では結合しなくても他の因子が共存することにより結合している可能性が考えられる。

申請者の研究は、*Drosophila lectin* が大腸菌等の一部のグラム陰性細菌と結合して菌を凝集し、免疫細胞へのassociation を促進することを示し、*Drosophila lectin* が病原体の認識に働く可能性を提示した。そして、この遺伝子を欠損したショウジョウバエ変異体を作製し、その個体を用いた解析から、このレクチンが大腸菌に対する感染防御に関与することを示唆した。本研究により、昆虫レクチンの感染防御への関与が初めて遺伝学的に示唆された。

本研究は、生物系薬学、生化学、分子生物学の各分野に対する貢献が大である。したがって、本審査委員会は、申請者が博士（薬学）の称号を授与されるにふさわしいと判定した。