

論文の内容の要旨

論文題目 マクロファージ関連細胞に発現する C タイプレクチン MGL1 及び MGL2

氏 名 築 地 信

【序】

多細胞生物における細胞間相互作用は、個々の細胞同士の認識に始まり、協調もしくは反発などを通して、組織を形成し生物現象の営みに貢献する。癌、炎症、感染症、自己免疫疾患、神経疾患などの病態において、糖鎖構造の変化に基づく細胞間相互作用の変化が生じていることが明らかになってきている。一方、マクロファージ関連細胞は生体のホメオスタシスに重要な細胞であり、体内を限無く循環し、生体の状況を把握するセンサー的役割を果たしている。

マクロファージ細胞表面の内在性 C タイプレクチン MGL(macrophage galactose-type C-type lectin)は、抗腫瘍活性を有する腹腔滲出マクロファージ上に発見され、組み換え MGL を用いて *in vitro* で認識糖鎖構造を解析した結果、腫瘍特異的に発現する糖鎖構造と重複したため、腫瘍認識分子として機能しうる可能性が示唆された。エンドサイトーシスレセプターとしての機能とホーミングレセプターとしての機能が示されている。免疫組織学的解析より、MGL 陽性細胞は、正常マウス組織の結合組織に局限すること、炎症感作時に真皮から所属リンパ節に移動すること、腫瘍組織に集積することなどが明らかになっている。

本論文では、第 1 章で、分化経路を明らかにすることを目指した *Mgl1* 遺伝子の転写制御に関与する転写因子の同定と、MGL の機能解明を目指した *Mgl1* 遺伝子欠損マウスの作製について、第 2 章で、肝臓へホーミングする樹状細胞に MGL が発現していることを、第 3 章で、異なる糖結合特異性を有する新規レクチン MGL2 の同定について、述べる。

【第1章 MGL1のゲノムクローニング、上流配列解析、クロモソームマッピング】

MGL陽性細胞の特徴づけを最終的な目標として、*Mgl1* 遺伝子の転写制御に関与する転写因子の同定を試みた。129/SvJ マウス由来ゲノムライブラリーより、MGL1 cDNA をプローブとしたブランクハイブリダイズ法と、PCR法を用いて、ポジティブクローンを取得した。得られたポジティブクローンの塩基配列を解読し、エクソン・イントロン構造を決定したところ、*Mgl1* 遺伝子は、全長4065残基からなり10個のエクソンから構成されていた。ルシフェラーゼ遺伝子上流に *Mgl1* 遺伝子上流配列をつないだベクターを、MGL陽性細胞であるマクロファージ様細胞株 RAW264.7 に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。そのベクター変異体を作製し転写制御領域の解析を行った。さらに、ゲルシフトアッセイによる結合する転写因子の同定を行った。その結果、PU.1 と NF-Y が同定された。PU.1 は骨髄球分化に必須であることと、NF-Y は単球からマクロファージへの分化段階に活性化することが知られている。MGL は単球には発現せず、組織球で発現していることを説明できる結果を得た。

平行して、生体内におけるMGLの関与する局面を明らかにするために *Mgl1* 遺伝子欠損マウスの作製を行うこととした。まず、MGL1に類似遺伝子が存在するかを確認することを目的に、2系統のマウスを用いた、interbackcross法による遺伝的マッピングを行った。その結果、11番クロモソーム上に存在するマーカー遺伝子 (*D11Mit5*, *Trp53*, *Eif4a1*, *Cd68*, *Htt*) と連鎖していることが明らかになった。他のクロモソーム上に類似遺伝子は見つからなかった。ターゲティングベクターを2種類作製し、ES細胞株 RW-4 にターゲティングベクターを導入し、相同組み換え体をPCR法およびサザンブロット法により同定し、ブラストシストにインジェクションし、キメラマウスを作製したが、変異遺伝子の生殖系伝達は起こらなかった。

【第2章 樹状細胞の肝臓へのホーミングに関与する MGL】

肝臓のリンパ節は、血中の外来抗原に対して免疫反応を惹起する過程に重要である。そのリンパ節に抗原情報を伝達するのは、血中を循環している樹状細胞 (dendritic cells; DCs) である。DCs は、肝臓の Kupffer 細胞 (KCs) に接着することで肝臓へホーミングし、一部の細胞は Disse 腔に沿って肝臓のリンパ節に抗原の情報を伝達することが、ラットのモデルで明らかになっている。この KCs と DCs の接着の分子メカニズムは不明であったが、*N*-acetylgalactosamine (GalNAc) によって阻害されることより、糖鎖認識分子の関与が示唆された。そこで、消化管系リンパ液由来の DCs、肝臓由来 KCs、チオグリコレート誘導腹腔滲出細胞 (TG) の RNA を抽出し RT-PCR 法にて、GalNAc に特異性を示すと考えられる、MGL、アシアログライコプロテインレセプター (*Asgr1*, *Asgr2*)、Kupffer 細胞レセプターである (*Kcr*) の4種類の発現を検出した。その結果、DCs には、*Mgl* と *Asgr2* が発現していた。一方、KCs には全てのレクチンが発現していた。GalNAc を介する糖鎖認識分子として、MGLを含むCタイプレクチンが発現し、ホーミングに関与していることが明らかになった。

【第3章 糖結合特異性の異なる新規レクチン MGL2 のクローニング】

ゲノムサザンブロット解析時に、いくつかの制限酵素で消化した場合に、エキストラバンドが出るのが明らかになり、MGL1 に類似遺伝子の存在が考えられた。Mgl1 遺伝子欠損マウスの解析を行う上で問題になることと、多様な糖鎖構造を見分ける分子としてのレクチンが、多様性を有する可能性があることが考えられたので、新規レクチンの同定を試みることにした。マウス MGL1 とヒト MGL の配列に相同性を有する新規配列を EST データベースより検索した。得られた配列断片をもとにプライマーを作製し RAW264.7 細胞株から作製した cDNA を用いて、RACE 法にて全長をクローニングした。その遺伝子を MGL2 と命名した。この遺伝子は MGL1 と高い相同性を有していたのでスプライシング産物の可能性が考えられた。そこで、ゲノム構造の解析を行った。その結果、Mgl2 遺伝子は、エクソン・イントロン構造が酷似の全長 7136 残基からなる異なる遺伝子としてコードされていた。さらに、マウス BAC ライブラリーのデータベースを検索したところ、Mgl1 遺伝子と Mgl2 遺伝子をともにコードする BAC クローンが同定された。これらは 11 番クロモソームにマッピングされており、類似遺伝子である *Asgr1*、*Asgr2* とクラスターを形成していることも明らかになった。この遺伝子の細胞外ドメインからなるリコンビナント蛋白質を作製し、糖結合特異性について ELISA にて解析した。その結果、MGL1 は Le^x 構造に親和性を有するが、MGL2 はその構造ではなく、単糖の GalNAc に親和性を示した。現在までに得られている MGL1 に結合するモノクローナル抗体 (LOM-4.7、LOM-8.2、LOM-8.7、LOM-11、LOM-14) の反応性を ELISA にて検討した。その結果、LOM-14 だけが MGL2 にも結合した。それらの抗体を用いて、このレクチンの発現について解析した。チオグリコレート誘導腹腔滲出細胞を LOM-14 と LOM-8.7 を用いて二重染色した。その後、LOM-8.7 の結合性で高結合性と低結合性の細胞に分画した。それら細胞の mRNA を回収し MGL1 および MGL2 の遺伝子について RT-PCR 法にて発現を確認した。その結果、どちらの細胞にも遺伝子が検出され MGL1 と MGL2 の遺伝子発現に関しては同一細胞で共発現していることが明らかになった。さらに、Mgl1 遺伝子欠損マウスの凍結切片を LOM-8.7 と LOM-14 で染色したところ、LOM-8.7 の反応性はなくなっていたが、LOM-14 の染色像に変化が見られなかった。Mgl1 遺伝子および Mgl2 遺伝子の上流配列の比較より、PU.1 結合領域は保存されていたが、NF-Y については異なっていた。他にも異なる領域が存在した。これは異なる発現制御機構が存在する可能性を示している。ある刺激条件下もしくは分化段階でこれら遺伝子の発現量比が変化する可能性が考えられる。

【総括】

Mgl1 遺伝子の発現制御に関与する転写因子の同定を行ったところ、PU.1 と NF-Y の関与が明らかになった。PU.1 は骨髓球分化に必須であることと、NF-Y は単球からマクロファージへの分化段階に活性化することが知られている。MGL は単球には発現せず、組織球で発現していることを説明できる結果であった。

ラットにおいて、肝臓にホーミングする樹状細胞と肝臓のKupffer細胞にMGLを含むCタイプレクチンの発現が確認され、ホーミングレセプターとして機能する可能性が示された。

マウスにおいて、高い相同性を有する二つのMGL（MGL1とMGL2）が存在することが明らかになった。それらは異なる糖特異性を有していた。チオグリコレート誘導腹腔滲出細胞においては、共発現していたことより、協調的に働く可能性が示された。しかし、MGL1およびMGL2の上流配列の比較より、PU.1結合領域は保存されていたが、NF- κ Bについては異なっていた。他にも異なる領域が存在した。これより、異なる発現制御機構が存在する可能性が示された。*Mgl1*遺伝子および*Mgl2*遺伝子は、マウスクロモソーム11番に、他のCタイプレクチン（*Asgr1*および*Asgr2*）とクラスターをなしていることが明らかになった。今後、これらCタイプレクチンの使い分けによる多様性の形成について解析する必要性が示された。